《现代化学基础丛书》编委会

现代化学基础丛书 9

天然产物化学导论

徐任生　主编

叶　阳
赵维民　副主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书介绍了天然产物分离与化学结构研究(波谱应用)的基本理论与方法,扼要叙述了各类主要天然产物的化学结构、特征、应用及其结构的近代研究方法及某些全合成与生物合成途径。内容包括植物与中草药的各类化学成分;海洋生物、昆虫激素及信息素;常见的天然产物成分分离方法与结构测定;立体化学、化学合成与生物合成及主要生物活性,并举例解析。书中尽量采纳我国科学家的研究成果,其中许多是作者的学术成果总结。

本书可作为天然有机化学、药物化学、中草药化学、植物化学、有机化学、分析化学及植物学等有关专业研究生的教材与参考书。

图书在版编目(CIP)数据

天然产物化学导论 / 徐任生主编.—北京: 科学出版社,2006

(现代化学基础丛书 9/朱清时主编)

ISBN 7-03-016491-1

Ⅰ. 天… Ⅱ. 徐… Ⅲ. 天然有机化合物 Ⅳ. O629

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 136597 号

责任编辑:周巧龙 吴伶伶 王国华 / 责任校对:张 琪

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:王 浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006 年 7 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2006 年 7 月第一次印刷 印张:28 1/2

印数:1—3 000 字数:534 000

定价: 58.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

《现代化学基础丛书》序

如果把 1687 年牛顿发表“自然哲学的数学原理”的那一天作为近代科学的诞生日，仅 300 多年中，知识以正反馈效应快速增长：知识产生更多的知识，力量导致更大的力量。特别是 20 世纪的科学技术对自然界的改造特别强劲，发展的速度空前迅速。

在科学技术的各个领域中，化学与人类的日常生活关系最为密切，对人类社会的发展产生的影响也特别巨大。从合成 DDT 开始的化学农药和从合成氨开始的化学肥料，把农业生产推到了前所未有的高度，以至人们把 20 世纪称为“化学农业时代”。不断发明出的种类繁多的化学材料极大地改善了人类的生活，使材料科学成为了 20 世纪的一个主流科技领域。化学家们对在分子层次上的物质结构和“态-态化学”、单分子化学等基元化学过程的认识也随着可利用的技术工具的迅速增多而快速深入。

也应看到，化学虽然创造了大量人类需要的新物质，但是在许多场合中却未有效地利用资源，而且产生了大量排放物造成严重的环境污染。以至于目前有不少人把化学化工与环境污染联系在一起。

在 21 世纪开始之时，化学正在两个方向上迅速发展。一是在 20 世纪迅速发展的惯性驱动下继续沿各个有强大生命力的方向发展；二是全方位的“绿色化”，即使整个化学从“粗放型”向“集约型”转变，既满足人们的需求，又维持生态平衡和保护环境。

为了在一定程度上帮助读者熟悉现代化学一些重要领域的现状，科学出版社组织编辑出版了这套《现代化学基础丛书》。丛书以无机化学、分析化学、物理化学、有机化学和高分子化学五个二级学科为主，介绍这些学科领域目前发展的重点和热点，并兼顾学科覆盖的全面性。丛书计划为有关的科技人员、教育工作者和高等院校研究生、高年级学生提供一套较高水平的读物，希望能为化学在新世纪的发展起积极的推动作用。

朱清时

2005 年 2 月

编 者 的 话

我国地域辽阔,植物、动物、微生物等天然资源十分丰富,中草药应用历史悠久,因而天然产物化学研究有着得天独厚的优势。天然产物已成为我国有机化学与药物化学研究的重要对象。许多高等院校与研究机构都设有天然药物化学、天然产物化学、中草药化学或植物化学研究室并招收研究生。我国天然产物化学的研究成果愈来愈受到国际上的重视。1993 年,我们应科学出版社之邀编著出版了《天然产物化学》一书,受到了读者的欢迎。随着科学技术的飞速发展,新资料、新信息、新的报道不断涌现,我们又组织编写了内容更新、更丰富和更实用的《天然产物化学》(第二版),并于 2004 年出版。全书约 200 万字,内容涉及各类天然产物的分离、结构与特征,天然产物结构的近代研究方法,包括立体化学、化学反应、各种波谱方法、全合成与生物合成及主要生物活性,并举例解析,理论与实际相结合,同时提供了一些相关资料与原始文献,并且尽可能采纳我国科学家的研究成果与研究实例,使该书具有中国特色。目前科学出版社拟出版系列丛书,供研究生作教材之用,希望我们在《天然产物化学》(第二版)的基础上撰写一本内容扼要实用、基本包括其核心内容的简写本,为此我们编写了《天然产物化学导论》一书。本书各章节编写人员均为对该章节内容熟悉、掌握资料较多的专家与学者,书中许多内容是作者的学术成果总结,因而本书具有自己的特色。

本书承中国科学院上海药物研究所领导的支持,刘瑾协助编排目录、索引及其他许多工作,在此一并致谢。

由于编写时间仓促,不少地方可能仍有错误,望读者给予批评、指正,以便今后再版时修改与补充。

编　者

目　录

第一章　概　　论

天然产物化学是包括一切源自植物、动物、昆虫及微生物代谢产物的化学，如生物碱、黄酮体、萜类、配糖体、氨基酸、蛋白质及糖类等；若依功能分，又有药物、甜味剂、色素等。新技术与信息技术的普及、各学科的相互渗透使天然产物化学已涉及许多生命现象，如药物作用过程中配体与受体的作用机理、药物在人体内的代谢产物，以及蛋白质、酶的化学，这使天然产物化学与以内源性物质为主要研究对象的生物化学出现了交叉。国际上一些著名的天然产物化学家也正在向这一方向过渡，巴登、中西香尔等于 1999 年编著出版《天然产物化学综论》(*Comprehensive of Natural Products Chemistry*)，主要阐述了酶、蛋白质、DNA、RNA、多糖等多种与生命有关的物质的化学。

在药物研究方面，迄今临床应用的药物 1/3 以上源自天然产物。它们直接来自天然产物或是以天然产物的活性成分为先导进一步发展的衍生物、类似物或全合成产物。高通量筛选系统(high throughput screening)、组合化学(combinatory chemistry)、计算机化学(computer chemistry)及为完成人体基因图谱而带动的基因药物研究与基因芯片筛选都推动着新药的研究，但这些都不能代替从天然产物中寻找新药，因为只有从天然产物中才可找到结构新颖、生物作用独特的生物活性成分以引导新药研究。众所周知的阿司匹林就是从植物中广泛存在的水杨酸衍生而成的乙酰水杨酸。局部麻醉药普鲁卡因(procaine)是根据植物可卡因(cocaine)的结构研究得到的。我们的祖先早在 17 世纪初就从乌头中发现了结晶体，但对它的系统研究还是欧洲化学家从 19 世纪开始的。19 世纪初，化学家对鸦片进行了研究，分离得到止痛成分吗啡与止咳成分可待因等多种生物碱。以后又从南美洲治疗疟疾的植物——金鸡纳中分离得到了抗疟成分奎宁，从而加速了许多植物药的相继发现，如副交感神经抑制剂阿托品(atropine)、抗胆碱药东莨菪碱(scopolamine)、解痉药莨菪碱(hyocyamine)、缩瞳药毛果芸香碱(pilocarpine)、拟胆碱药毒扁豆碱(physostigmine)、平喘药麻黄碱(ephedrine)、子宫收缩药麦角新碱(ergometrine)、治阿米巴痢疾药吐根碱(emetine)、驱虫药山道年(santonin)、强心药地高辛(digoxin)和去乙酰毛花苷(deslanoside)等。这些植物药的发现极大地丰富了天然产物化学，使它受到了高度的重视并促进了药物化学的发展。今天它们仍具有强大的生命力，大多数一直沿用至今并得到发展。

20 世纪 50 年代治疗高血压药利血平(reserpine)与抗癌药长春新碱(vincristine)的发明又一次掀起天然产物化学研究的热潮，从而推动了抗癌新药紫

杉醇(paclitaxel)、喜树碱(camptothecin)、足叶乙苷(etoposide)及其类似物的问世。70年代我国科学家从中药黄花蒿中发现抗疟新药青蒿素(artemisinin 或 qinghaosu),又引起了国际上对中药研究的重视。

我国地域辽阔,各地气象差异悬殊,天然产物资源丰富,种类繁多,中草药资源多达12 000多种,中医药应用历史悠久,因而从事天然产物研究的条件得天独厚。中草药历来都是我国有机化学家研究的重要对象。早期留学归来的有机化学家回国后的研究课题往往从中草药开始。到目前为止,国际上常用的植物药如阿托品、麦角新碱、山道年、东莨菪碱、利血平、长春新碱、地高辛、喜树碱、10-羟基喜树碱、紫杉醇等都先后由我国有关单位利用国内的植物资源分离成功并投入生产,供应国内与国际市场。我国科学家也独自研制成一系列植物新药:除青蒿素及其衍生物蒿甲醚(artemether)、青蒿琥酯(artesunate)与二氢青蒿素(dihydroartemisinin)外,还有从千层塔(*Huperzia serrata*)中分离得到的改善记忆缺损并可望治疗阿尔茨海默病的石杉碱甲(huperzine A);从唐古特莨菪(*Scopolia tangutica*)中分离得到的胆碱酯酶抑制剂山莨菪碱(anisodamine)与樟柳碱(anisodine);从栝楼(即天花粉,*Trichosanthes kivilowii*)中分离得到的引产药天花粉蛋白(trichosanthin);从五味子(*Schisandra chinensis*)中分离得到的抗肝炎药五味子素(schisandrin)及其衍生物联苯双酯(biphenyl-dimethyl-dicarboxylate)。其他还有从大蒜中分离得到的抗菌药大蒜新素(二烯丙基三硫)、鱼腥草中的鱼腥草素(癸酰乙醛)、三棵针及黄连中分离得到的黄连素(berberine)、镇痛镇静药延胡索乙素(tetrahydropalmatine)等都已批量生产,成为国内常规用药。这些成绩展现了中药现代化的前景。1987年中药新药审批办法颁布后,又有一批新药批准上市,如一类新药参一胶囊,即人参皂苷 Rg_3 及二类新药由薏苡仁油制成的康莱特注射液,以β-榄香烯(β-elemene)为主的郁金香(*Cureuma wenyujin*)提取液制成的榄香烯乳剂等,都是很好的治疗癌症药物或辅助药。它们的特点是有免疫促进作用,无不良反应,或与化疗药物合并用药有增效作用。然而上述某些新发明没有申请专利,忽略了知识产权的保护!

除发展药物外,天然产物化学还涉及工业和农业,如天然甜味剂[甜叶菊中的甜菊苷(stevioside)及甘草甜素(glycyrrhizin)]、天然色素[栀子黄素(gardenin)、橘黄素(tangeretin)、紫草素(shikomin)等]。天然农药除虫菊酯(pyrethrin)及其衍生物均已生产应用。它们的分离、纯化、结构鉴定及生产、生产流程和产品的质量控制等都需要天然产物化学的知识和技术。

近年来,科学家们从天然物中陆续发现了不少营养辅助剂,如绿茶中的没食子酰表没食子儿茶素(EGCG)、葡萄中的白藜芦醇(resveratrol)及大豆中的染料木黄酮(genistein)等有防癌治癌的辅助作用。这是天然产物化学的又一次新贡献。

计算机的应用将新技术与新仪器推向高精密度、高准确性、微量化与自动化,

天然产物的分离也从常规的溶剂分离、层析分离向高效自动化发展。目前高效液相色谱(HPLC)、离心分配色谱(centrifugal partition chromatography,CPC)、超临界流体萃取(supercritical fluid extraction,SFE)已被广泛应用。用于结构分析的高分辨质谱(HRMS)、二维核磁共振谱(2D-NMR)及X射线衍射方法已日趋普及。同时分离与结构鉴定相结合的LC-MS、LC-NMR技术正在推广。这些都使天然产物的分离、纯化与结构研究逐渐趋向常规化与自动化。以往需要几年才能完成的工作现在只用几天甚至几小时就可以解决。样品的用量已由毫克量进入微克水平。例如,长期以来难以解释的下丘脑抑制因子(hipothalamie inhibitory factor,HIF)与G毒毛旋花苷(quabain)的区别点,现在已由中西香尔等用微克量样品以^{1}H-NMR谱解决了。

学科间的相互渗透与协作是科学发展的动力之一。天然产物化学研究与医学、生物、农业等密切配合,才会有生命力;否则,天然产物化学家辛苦分离得到并鉴别的新化合物只能作为一个资料记载。一旦发现具有生物活性,特别是具有抗肿瘤、抗HIV、治疗阿尔茨海默病等作用的化合物,将引起广泛的关注。即使它们的资源有限,也可以通过化学合成、组织培养、细胞培养或生物合成等多种途径进一步发展,使它们成为有应用价值的天然产物,服务于人类的健康。

当我们对天然产物的历史进行回顾、对现状进行归纳总结时,可以明显地看到天然药物的研究硕果累累,为人类健康、工农业的发展做出了巨大贡献。但从丰富的植物、动物、微生物资源来看,到目前为止发展的仅是极小部分,也是中草药宝库中的很小一部分,可以进一步研究的题材很多。从中药中寻找天然活性物质是几辈人都完成不了的事业,它是个挖掘不完的“金矿”,前景光明,而且是中国特有。只要我们持之以恒、不懈努力,必将会有重大发现,从而为人类科学发展做出巨大贡献。

第二章　天然产物的提取分离

天然产物的纯化是利用波谱技术确定新化合物的结构、理化性质及生物活性的前提。然而,即使在分离技术不断发展的今天,天然产物的分离纯化仍是一项相对繁琐、耗时的工作。在一个有开发价值的天然产物被发现之后,寻找能有效地降低成本获得该物质的分离方法便成为关键。天然产物的提取与分离在天然产物化学研究中占有重要地位。

在设计纯化方案时,通常是在初始阶段使用分离效能不高但具有大量处理样品能力的纯化手段,如选择性提取、沉淀过滤及简单的常压柱色谱分离等。合理地选择单一或混合溶剂进行提取是进行样品有效分离纯化的第一步。以低极性溶剂提取可得到亲脂性的组分,醇类溶剂则对极性与非极性物质都可溶出。若开始阶段采用极性大的溶剂提取,接着用溶剂萃取方法可将提取物按极性分成不同的部位。

植物成分的提取分离方法很多,本章仅从实用观点出发,对一些常用的提取分离技术做一简略介绍。

第一节　天然产物的提取

提取是进行植物化学成分研究的第一步。选择适当的提取方法不仅可以保证所需成分被提出,还可以尽量避免不需要成分的干扰,简化后续的分离工作。有时只经过一步提取,即可获得单体成分。

一、传统溶剂提取法

实验室传统的溶剂提取法包括浸渍法、渗漉法、煎煮法、回流提取法及连续回流提取法等。

用浸渍法提取植物成分时,可采用极性依次增大的溶剂提取。例如,依次采用二氯甲烷、甲醇及水在室温条件下对植物成分进行提取。

渗漉法是目前国内外普遍采用的方法,效率比浸渍法高,且可用以提取较大量的植物样品。根据需要可以采用单一溶剂进行渗漉,也可使用几种溶剂依次进行渗漉。浸渍法和渗漉法一般提取温度较低,提取物中所含杂质较少。

与上述两种方法相比,煎煮法、回流提取法及连续回流提取法可在较高温度下对植物成分进行提取,提取效率更高,但杂质也相对较多。连续回流提取法还具有

操作简单、节省溶剂的特点。在不了解植物所含成分是否稳定的情况下,一般应避免高温提取,以防植物成分发生变化。

在可用的提取溶剂中,水的成本最低,且非常安全。一些商品化的天然产物,如小檗碱、芸香苷、甘草酸等在制备过程中采用水为提取溶剂。但用水提取时,提取液中的杂质较多,如无机盐、蛋白质、糖和淀粉等,给进一步分离带来许多困难。乙醇是最常用的有机溶剂,具有低毒、价廉、沸点适中、便于回收利用等特点,且对植物细胞的穿透能力强,除了蛋白质、黏液质、果胶、淀粉和部分多糖等外,大多数有机化合物都能在乙醇中溶解。当植物中所含成分较为简单或某一成分含量较高时,可根据其极性大小或溶解性能,选择一种适当的溶剂把所需的成分提取出来,而杂质留在植物残渣里。

二、水蒸气蒸馏法

水蒸气蒸馏法适用于提取能随水蒸气蒸馏而不被破坏的植物成分。这些化合物与水不相混溶或仅微溶,且在约 100℃ 时有一定的蒸气压。当水蒸气加热沸腾时,能将该物质一并随水蒸气带出。例如,植物中的挥发油,某些小分子生物碱如麻黄碱、菸碱、槟榔碱等,以及某些小分子的酸性物质如丹皮酚等,均可应用水蒸气蒸馏法提取。对一些在水中溶解度较大的挥发性成分,可用低沸点非极性溶剂如石油醚、乙醚将其抽提出来。

三、超临界流体提取法

超临界流体提取是利用溶剂在超临界条件下流体的特殊性能对样品进行提取、自 20 世纪 80 年代迅速发展起来的一种提取方法。许多超临界流体具有较好的扩散性能,与液体相比,具有更低的黏度和更高的扩散速度,使其适合于对植物成分的提取。该方法提取速度快,通过改变压力及加入改性溶剂,可以调整溶剂的溶出能力。选择适当的温度与压力能提高提取的选择性能,并获得更干净的提取物。该方法无需使用大量的有机溶剂,常用的超临界流体为二氧化碳,具有显著的安全性。超临界流体提取法尤其适用于对热及化学不稳定的化合物的提取,以及用于从混合物中提取出低极性的组分[1,2]。

利用超临界流体提取方法获得的天然产物的种类日益增多。如从烟草中提取尼古丁,从茶叶及咖啡中提取咖啡因,从丹参中提取丹参酮ⅡA 等。Liu 报道利用超临界流体二氧化碳从植物星状茴芹中提取茴香脑(纯度 >90%)比用传统的溶剂提取方法更有效,后者不仅工艺繁琐、费时而且成本更高[3,4]。

四、固相提取法

固相提取法有下面两种形式:①样品中的干扰性杂质被吸附于柱上,而所需的

化合物被洗脱下来;②需要的化合物被保留在柱上,而干扰性杂质被洗脱下来。在上述后一种情况下,固相提取法可起到浓缩的作用,通过更换溶剂可将所需的化合物从短柱上洗脱下来。

Hakala 等将番茄酱的石油醚提取物通过一装有硅胶的短柱,并用石油醚进行洗脱,除番茄红素之外的胡萝卜素类化合物都被洗脱下来。用氯仿可将番茄红素洗脱下来,经过进一步半制备型高压液相色谱分离后得到纯品[5]。

第二节　天然产物的分离

一、经典方法

这里的经典分离方法是指从早期至今一直被采用的方法,通常操作比较简单,无需复杂、昂贵的仪器。

(一) 溶剂法

天然产物的结构千差万别,分子结构中极性基团的多少及取代位置决定了其在不同溶剂中的溶解性。有机物一般具有相似相溶特性,即极性化合物易溶于极性溶剂,非极性化合物易溶于非极性溶剂,同类分子或官能团相似的彼此互溶。

在获得提取物之后,用溶剂分配法可快速得到有效部位,同时除去大量不需要的物质。该方法曾被用于从植物中寻找抗肿瘤[6]及抗 HIV[7]的活性组分以及从番荔枝科植物中检测并分离番荔枝内酯类化合物[8]。

在提取分离皂苷类成分时,可先用工业乙醇提取,对浓缩后的水液依次用低极性溶剂,如氯仿、乙酸乙酯从水中萃取出亲脂性成分,然后通过正丁醇与水分配可使皂苷类成分富集于正丁醇部位,从而起到初步纯化作用。在分离生物碱类成分时,在调节水相的酸碱性后,利用有机溶剂进行萃取,可使生物碱类成分得到富集,并可使强碱性生物碱与弱碱性生物碱得到初步分离。

实验室提取分离所用有机溶剂通常都呈惰性,即与所处理化合物不起化学反应。但惰性也不是绝对的。例如,所用的甲醇、乙醇或正丁醇有时会与天然产物中的羧基形成相应的酯;用乙酸乙酯提取分离时,可能发生乙酰基转移;使用丙酮时,可能会与天然产物中的二醇基团形成缩酮结构。

(二) 分馏法

利用提取成分具有不同沸点的性质,可使用分馏法对植物成分进行分离。例如,在分离毒芹总碱中的毒芹碱和羟基毒芹碱时,以及分离石榴皮中的伪石榴皮碱、异石榴皮碱和甲基异石榴皮碱时,均可利用常压或减压分馏方法进行初步分离,然后再精制纯化。

(三) 沉淀法

利用有机物的溶解性或与某些试剂产生沉淀的性质可实现植物成分的初步分离。对所分离成分来讲,这种沉淀反应应是可逆的。

中性乙酸铅或碱式乙酸铅在水或稀醇溶液中能与许多物质生成难溶性的铅盐或络盐沉淀,利用这种性质可使所需成分与杂质分离。脱铅方法常采用通硫化氢气体,使沉淀分解并转为不溶性硫化铅沉淀而除去。脱铅的方法也可用硫酸、磷酸、硫酸钠、磷酸钠等,但生成的硫酸铅及磷酸铅,在水中有一定的溶解度,所以脱铅不彻底。由于方法比较简便,实验室中有时仍采用。几种实验室常用的沉淀剂见表2-1。此外,还有乙酸钾、氢氧化钡、磷钨酸、硅钨酸等沉淀剂。对多糖、蛋白质类成分等可加丙酮、乙醇或乙醚沉淀。

表2-1　几种实验室常用的沉淀剂

常用沉淀剂	化合物
中性乙酸铅	酸性、邻位酚羟基化合物,有机酸,蛋白质,黏液质,鞣质,树脂,酸性皂苷,部分黄酮苷
碱式乙酸铅	除上述物质外,还可沉淀某些苷类、生物碱等碱性物质
明矾	黄芩苷
雷式铵盐 $NH_4[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]\cdot H_2O$	生物碱
碘化钾	季铵生物碱
咖啡碱、明胶、蛋白质	鞣质
胆固醇	皂苷
苦味酸、苦酮酸	生物碱
氯化钙、石灰	有机酸

(四) 膜分离法

利用小分子物质在溶液中可通过具有一定孔径的膜,而大分子物质不能通过的性质可达到分离的目的。膜分离法常用于蛋白质、多肽、多糖等大分子化合物与无机盐、单糖、双糖等小分子化合物的分离,如大豆蛋白的工业化生产中即采用膜分离法。根据所用膜的孔径大小不同可将膜分离法分为超滤及纳滤。膜分离方法因不使用大量有机溶剂具有很大优越性,随着膜分离技术的不断改进,膜分离法在天然药物的研发与生产中将获得更加广泛的应用。

(五) 升华法

固体物质加热时,直接变成气态,遇冷凝结成原来的固体,此现象称为升华。

植物中凡具有升华性质的化合物,均可用此法进行纯化,如樟木中的樟脑、茶叶中的咖啡碱以及存在于植物中的苯甲酸等成分。升华法简单易行,但往往产率低,还可能伴有分解现象。

(六) 结晶法

植物成分中大半是固体化合物,其中一些化合物可以通过结晶达到分离纯化的目的。初析出的结晶通常会带有一些杂质,需要通过反复结晶,才能得到纯粹的单一晶体。

有时植物中某一成分含量特别高,找到合适的溶剂进行提取,将提取液冷却或稍浓缩,便可得到结晶。利用结晶法进行植物成分的分离纯化,不需复杂的仪器设备,比制备色谱分离方法的成本低,适于大量制备。结晶所选用的溶剂最好对所需成分的溶解度随温度的不同而有显著的差别,即热时溶解,冷却则析出。对杂质来说,在该溶剂中应不溶或难溶。也可采用对杂质溶解度大而对欲分离物质不溶或难溶的溶剂,可用洗涤法除去杂质后再用合适溶剂结晶。

(七) 几种杂质的脱除

1. 叶绿素的脱除

叶绿素能溶于一般有机溶剂,特别是氯仿、乙醚等低极性溶剂,也溶于氢氧化钠等碱性溶液。例如,从毛花洋地黄叶中提取地高辛时,在叶粉发酵后用70%乙醇提取,提取液浓缩后,先用氯仿与稀碱溶液洗涤去除叶绿素,再用丙酮提取产物[9]。如果不存在溶解度的问题,将提取物通过一个装有十八烷基硅胶(C_{18})的柱子,可把其中所含的叶绿素方便地去除。例如,在从植物 *Dryas octopetala* (Rosaceae)中分离黄酮苷之前,先将该植物的乙醇提取物通过一硅胶短柱以除去其中的单宁,然后再经过一个 C_{18} 短柱可清除其中所含的叶绿素[10]。

2. 蜡状物质的脱除

蜡质可溶于石油醚和乙醚,因而可用这些溶剂处理先去除植物所含的蜡质,再进一步用其他溶剂提取。也可用乙腈处理植物提取物除去其中所含的蜡质。Elliger 等将植物 *Petunia integrifolia* (Solanaceae)的氯仿提取物悬浮于沸腾的乙腈中搅拌 1h,冷却至 5℃后,析出蜡状的固态物质[11]。Zheng 在对植物大花黄花蒿 *Artemisia annua* (Asteraceae)中具有细胞毒性的黄酮类和萜类物质进行分离时,也采用了乙腈沉淀的方法,对该植物的地上部位先以己烷提取,将提取物溶于20mL 氯仿中,蜡状物质在加入 180mL 乙腈后析出[12]。

3. 单宁类物质的脱除

在进行生物活性测试时,有时需要从植物提取物或某一部位中去除单宁类物质。使用聚酰胺柱色谱法可有效脱除单宁类成分。Tan 等将该方法用于筛选植物提取物对 HIV Ⅰ型逆转录酶的抑制活性,并比较了几种去除单宁的方法[13]。对于少量用于生物活性测试的植物提取物,可取 3mg 该提取物溶于最少量的水中,然后加到装有 400mg 聚酰胺粉的玻璃柱(10cm× 0.6cm)上。依次用 2mL 水、2mL 50%甲醇及 5mL 无水甲醇洗脱,收集所有的流分。甲醇可将含有两个或三个酚羟基的非单宁类化合物洗脱下来,即大部分的黄酮类化合物可被回收。该方法存在的问题在于一些具有酚羟基的非单宁类物质也可能被除去。

二、色谱分离方法

早在 20 世纪初,Tswett 首先应用液-固吸附色谱成功地分离了植物色素。直到 20 世纪 30 年代,Kuhn 和 Lederer 在氧化铝和碳酸钙柱上制备分离了α-、β-胡萝卜素后,色谱分离技术才引起化学家的重视。20 世纪 60 年代末出现了高效液相色谱,它在分离速度及分辨率上比起经典的液相柱色谱具有极大优越性。高效液相色谱仪可配以紫外、折光率、蒸发光散射、荧光等不同类型的检测器,用于各种化合物的分析、分离。近年来,高效液相色谱仪与质谱、核磁共振谱仪的联机使用,更加提高了高效液相色谱仪的应用范围和效能。本小节对各种色谱方法进行简单介绍。

(一) 基本原理

色谱法是利用不同的物质在固定相与流动相中不同的平衡分配系数来进行分离的一种方法。在色谱分离中,试样混合物在固定相和流动相之间连续不断地进行分配平衡,不同的化合物由于它们之间的理化性质的差异,在两相中存在的量也各不相同。

(二) 色谱法的分类

色谱分离所用的固定相与流动相互不相溶。流动相只能是气相和液相,固定相只能是固相和液相。当流动相为液体时,称液相色谱;当流动相为气体时,称气相色谱。

另外一种分类方法是按色谱过程的机理来分类。利用吸附剂表面对不同组分吸附性能的差异来达到分离的目的,称吸附色谱。利用不同组分在流动相和固定相之间的分配系数不同而分离的,称分配色谱。利用分子大小不同而阻滞作用不同进行分离的,称排阻色谱。利用不同组分对离子交换剂亲和力不同进行分离的,

称离子交换色谱。另外,根据固定相与流动相的相对极性大小,又可分为正相色谱与反相色谱。

(三) 液-固色谱分离

固定相为固体时的液相色谱称液-固色谱。液-固色谱的固定相可呈薄层形式铺在玻璃板或其他载体上,也可装在色谱柱内,前者称为薄层色谱,后者称为柱色谱。

1. 制备型薄层色谱

制备型薄层色谱是将吸附剂均匀地铺在玻璃板上,把欲分离的样品点加到薄层上,然后用合适的溶剂展开再分别将色带刮下以达到分离的目的。它具有简便易行、快速灵敏等优点。常用的吸附剂为硅胶及氧化铝,可用它来分离亲脂或亲水性物质。在传统的制备型薄层色谱中,流动相靠毛细管作用力流经固定相。此外,流动相可靠外力强迫流经固定相,如离心薄层色谱和加压薄层色谱[14,15]。

(1) 传统制备型薄层色谱

传统制备型薄层色谱(PTLC)可以用来分离克量级的样品,但在大多数情况下人们采用该方法来分离毫克级的样品。该方法可配合柱色谱用于天然产物分离,是最简单的制备型分离方法之一。

薄层板最好先用溶剂展开一次,以减少所需化合物从吸附剂洗脱下来时可能混入的杂质。上样前先将样品溶于少量溶剂,低挥发性溶剂可引起点样带变宽,因此最好选用挥发性溶剂。点样带应尽可能狭窄,以获得更好的分离效果。如果点样带太宽,可用高极性的溶剂将薄层板展开至点样带上端约 2cm 处,可起到浓缩的作用。PTLC 板的分离效果受许多因素影响。一般来讲,一块 1mm 厚的20cm× 20cm 硅胶板或氧化铝板可分离 10~ 100mg 的样品。色谱板的尺寸可根据样品量与展开容器的大小而定,当样品量较大时,可在展开容器内放入多块制备型薄层同时展开。为尽量减少边缘效应,可在容器四周放一张浸入展开剂的滤纸促进容器被展开剂蒸气饱和。PTLC 所用的洗脱剂条件可由分析型 TLC 来选择确定。由于两者所用吸附剂的颗粒大小几乎相同,可将分析型 TLC 的展开剂条件直接用于 PTLC。

(2) 离心薄层色谱

传统的制备型薄层色谱具有一些不足之处,主要包括:需将被分开的化合物色带从薄层板上刮下,并将其从吸附剂上提取出来;分离所需时间较长;在用溶剂对色带内化合物进行提取后,可能混入来自于吸附剂的杂质。为克服上述缺点,人们发明了离心薄层色谱法。离心薄层色谱技术主要是在传统的 PTLC 基础上运用离心力,促使流动相加速流经固定相。离心薄层色谱分离过程如图 2-1 所示。在加入样品后,随着洗脱液的洗脱,可得到各组分的同心圆状色带。圆的色谱板被置

于覆盖石英玻璃的色谱室内,这样可借助紫外灯对无色但有紫外吸收的色带进行观察。在色谱板的边缘,色带快速旋转脱离色谱板,并经色谱室内的流出管收集。然后可利用薄层色谱对所收集的流分进行分析。

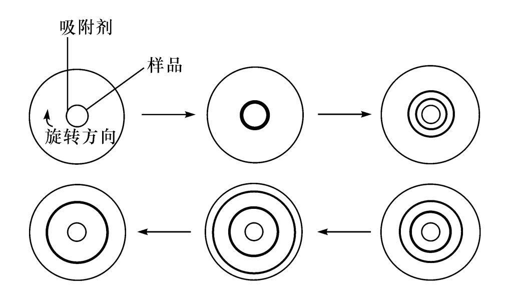


图 2-1　离心薄层色谱分离过程示意图

制备型离心薄层色谱可用于分离 100mg 左右的样品。其分辨能力低于制备型 HPLC,但操作简单,分离所需时间短。它与制备型薄层色谱相比,主要优点为:上样方便;产物可被洗脱下来,而无需将吸附剂刮下;可采用梯度洗脱方式;薄层经处理后,可反复使用。所用吸附剂除了普通薄层色谱用硅胶、氧化铝外,还可采用离子交换剂、葡聚糖凝胶等。

2. 柱色谱

相对于制备型薄层色谱,柱色谱可采用较大直径的色谱柱及更多的固定相,用以分离更大量的样品。

(1) 常压柱色谱

常压柱色谱是靠重力驱动流动相流经固定相的一种分离方法,因其操作简单而得到普遍应用。但常压柱色谱分离速度慢,只适合使用颗粒度较大的固定相,以保证足够快的流动相流速。分离时可将样品溶解在少量初始洗脱溶剂中,加到固定相的顶端。当拟分离样品在洗脱剂中溶解度不佳时,可采用固态上样法,即先将样品溶在一定溶剂中,加入少量固定相或硅藻土低温蒸干或自然挥干,然后把所得的粉末加到色谱柱的上部。在洗脱之前,可在样品上端覆盖一层沙子或玻璃珠,以防样品界面被破坏。常压柱色谱通常被用于粗提物的初步分离。采用梯度洗脱的方式可以提高常压柱色谱的分辨能力。

为克服常压柱色谱的不足之处,不断有人对制备型柱色谱方法进行改进。下面依次介绍几种常用的制备型柱色谱分离方法。

(2) 制备型加压液相柱色谱

制备型加压液相柱色谱包括利用各种装置施加压力进行的液相色谱。加压使

得在液相色谱中可使用颗粒度更小的吸附剂,从而获得更好的分离效果;另外,还可加快洗脱剂的流速,缩短分离时间。

根据分离中所用压力的大小可将制备型柱色谱分为快速色谱(约 2bar①)、低压液相色谱(<5bar)、中压液相色谱(5~ 20bar)及高压液相色谱(>20bar)。低压、中压与高压液相色谱的压力范围之间会存在一定交叠,只是为了区分方便,才分成这样三类。分离中所用色谱柱及固定相颗粒的大小需要根据分离的难易程度而定。一般对于难分离的样品,应采用小颗粒的固定相及稍长的色谱柱,分离所需压力也会加大。

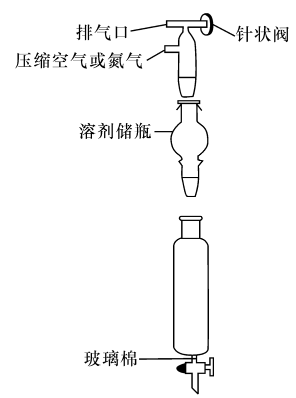


图 2 - 2 闪式色谱分离示意图

1) 快速色谱。为缩短常压柱色谱的操作时间,Still 等于 1978 年介绍了快速色谱技术[16]。图 2 - 2 给出一典型的快速色谱分离装置。该装置包括一装有活塞、长度适合的玻璃柱,可用干法或湿法将固定相加入其中。干法装柱效果更好,但需用大量溶剂使固定相完全润湿。在固定相的顶部最好加一层沙子,固定相的上端应留有足够的空间以便反复加入洗脱剂。另外,也可在柱顶部加一球形磨口储液槽。加样后,可施加高于大气压 1bar 的压力以加速样品的洗脱。在气体入口处可利用一针式阀门控制压缩气体的流速。利用不同尺寸的色谱柱对 0. 01~ 10. 0g 样品所进行的分离通常可在 15min 内完成。

快速色谱中使用最广泛的固定相为硅胶。一些粒度范围较窄的球形硅胶是专门为快速色谱而设计的。此外,也可采用具有一定粒度范围的非球形硅胶[16]。

可采用硅胶快速色谱对天然产物进行最终纯化,或用此法对粗提物或混合物进行初步纯化,然后再利用其他具有更高分辨率的色谱技术进行纯化。Nakatani 等在研究柠檬苦素类昆虫拒食活性成分时发现一些化合物在常压硅胶柱上逐渐被破坏,只有使用快速色谱分离和半制备型 HPLC 技术才能最终获得纯品[17]。

2) 低压液相色谱。目前使用最广泛的低压液相色谱系统是 Merck 公司生产的 Lobar 柱系列产品。预制色谱柱是由玻璃制成,填料有硅胶、RP-18、RP-8、NH_2、CN 及 diol 键合相硅胶等。色谱柱中的固定相被柱两端的熔融玻璃封闭。色谱柱两端连有聚四氟乙烯环的金属管可与输液泵相连,金属管及聚四氟乙烯环被柱端的旋钮固定于柱体(图 2 - 3)。

---

① bar 为非法定单位,1bar = 10^5 Pa,下同。

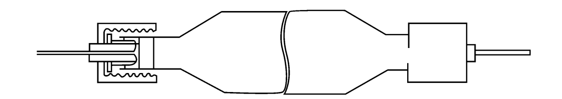


图 2－3　Lobar 预制柱示意图

Lobar 柱的分离效果有时可接近 HPLC 的分辨率。为获得更高的分辨率或更大的上样量,可将几根柱串联起来使用。Lobar 分离装置的简单性是这类色谱柱得以普遍采用的原因。Lobar 柱可以反复使用,反相柱比正相柱的使用寿命要长得多。Lobar 柱的固定相颗粒度相对较大(40~ 60μm),因此在低压操作条件下,洗脱液保持较高流速。可用注射器或输液泵将溶于适当溶剂中的样品加进柱内。因为分离过程中需要使用输液泵,一般采用组成恒定的洗脱剂。作者等利用反相 Lobar RP-18 色谱柱从草药山甘草(*Mussaenda pubescens*, Rubiaceae)中分离得到三萜皂苷类成分,所用溶剂系统为乙醇-水(1.1∶1)和乙腈-水(1∶1)[18]。

3) 中压液相色谱。Lobar 色谱分离系统具有使用方便、分辨率较高的优点。然而,用这些色谱柱难以分离 5g 以上的样品。中压液相色谱可采用更长、具有更大内径的色谱柱,可以一次性分离更多的样品。中压液相色谱比低压液相色谱使用的填料颗粒度更小,分辨率更高,需要使用更大的压力来维持适当的流速,所需压力可由压缩空气或往复泵提供。先利用分析型 HPLC 可以十分有效地选择适当的溶剂系统。Schaufelberger 等介绍了将高压液相色谱溶剂系统转换为中压液相色谱溶剂系统的方法[19]。

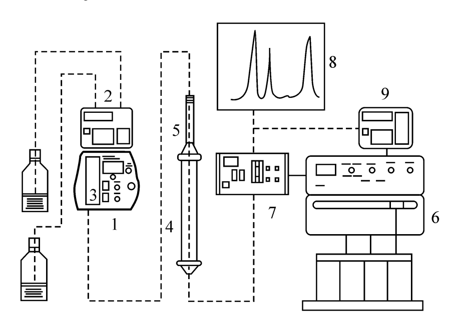


图 2－4　Büchi 公司 B-680A 中压液相色谱系统

1. B-688 泵;2. 梯度形成器;3. 进样装置;4. 玻璃柱;5. 前置柱;6. 流分收集器;
7. 检测器;8. 记录仪;9. 峰位检测器

Büchi 公司生产全套的中压液相色谱装置,其中包括各种规格的中压色谱柱,可用于分离 0.1~ 100g 的样品。活塞泵及可替换泵头可在最大压力为 40bar 时,

使流速在3~160mL/min之间调节。该系统接有溶剂梯度形成装置,并可用各种紫外检测仪检测(图2-4)。该系统的色谱柱由带有塑料保护膜的强化玻璃制成,因此可以观测到分离的进展情况。柱体大小可为130~1880mL,还可将色谱柱连接起来使用以提高分离能力。

在进行中压硅胶柱色谱分离时,可以用干法或湿法装柱。与湿法装柱相比,干法装柱可使固定相填充密度提高20%。虽然该类色谱柱的最大承受压力只有40bar,但使用颗粒度为15μm的固定相可以获得同HPLC柱类似的分离效果[20,21]。应用键合相固定相时,应采用湿法装柱。可以用注射器将样品直接加到色谱柱上或使用进样器进样。如果在色谱柱前连接一小的样品柱,也可以采用固体上样法。在制备型色谱柱前连一前置柱,在每次分离后将被污染的填料除去,利用甲醇-乙酸乙酯-己烷的冲洗顺序对硅胶固定相进行再生。但在重复使用几次之后,应将固定相废弃。键合相色谱柱更易于清洗,并具有更长的使用寿命,有时也采用聚酰胺或纤维素为固定相。

4) 高压液相色谱。随着高压液相色谱仪器的普及,有越来越多的天然产物研究工作采用了制备型高压液相色谱分离手段。高压液相色谱柱内填装的是粒度范围较窄的细小颗粒固定相,为使流动相流出,需要采用较高的压力。例如,在制备型高压液相色谱系统中使用颗粒度为5~30μm的固定相时,系统的复杂性及成本增大,但分辨率可得到较大的提高。

“半制备型”分离是指色谱柱直径8~10mm、内装颗粒度为10μm左右的固定相,可用于1~100mg混合物样品的分离[22]。制备型高压液相色谱分离大多采用恒定的洗脱剂条件,这样可减少操作中可能出现的问题。对于难分离的样品,有时也需采用梯度洗脱方式[23,24]。

利用大直径色谱柱进行一次分离或利用小直径色谱柱进行多次分离都可获得一定量的纯化合物。Suzuki等报道从豆科植物羽扇豆中分离一羽扇豆生物碱糖苷时,其最后的分离步骤采用分析色谱柱进行高压液相色谱分离,洗脱剂为含25%甲醇的乙醚溶液-5%氨水(50∶1)[25]。

制备型液相色谱分离通常采用分批进样的方式进行分离。为提高分离效率,Hadfield等将高压液相色谱改变为一可连续分离混合物的系统[26]。他们将少量的样品以适当的间隔加到一Whatman Partisil M9 250mm×9mm的色谱柱上,并对流分进行收集。采用这种方法,每24h可对2.5~3g已部分纯化了的苄基葡萄糖苷混合物进行分离。

(3) 减压液相色谱

减压液相色谱是利用真空为动力来加速流动相流经固定相的一种色谱分离方法。减压液相色谱法具有设备简单、分离时间短、有较理想的分离度、分离容量大等特点。

减压液相色谱的操作方式是在一装有熔融玻璃的短柱或布氏漏斗中干法加入吸附剂,轻击使吸附剂在重力作用下沉降。然后通过三通活塞抽真空,直至吸附剂变得坚实。放气之后,快速向吸附剂的表面加入低极性的溶剂,并继续抽真空。当溶剂流经全部柱体后,将柱抽干,即可准备上样。可将样品溶于适当的溶剂中直接加在柱上部,然后减压小心地将样品抽入吸附剂。另外,也可将样品先吸附于硅胶、氧化铝或硅藻土上。洗脱剂的选择应适当,先用低极性溶剂,然后再逐渐增大溶剂极性,在收集每份流分后将柱体抽干(可减少流分之间的相互交叉)。Zarate 等利用减压液相色谱法分离姜(*Zingiber officinale*)中的辛辣成分,将姜醇与姜烯酚完全分开[26]。

(4) 干柱色谱

干柱色谱法是将干的吸附剂装入色谱柱中,将待分离的样品配成浓溶液或吸附于少量填料上,然后再上样。洗脱液依靠毛细作用流经色谱柱,当接近色谱柱底部时,停止洗脱,将吸附剂从柱中挖出,用适当的溶剂将各色带中的成分洗出。在干柱色谱中,没有洗脱液从色谱柱流出,色带明显分开。干柱色谱耗时短,且节省溶剂。

可利用具有相同吸附剂的薄层色谱来推测干柱色谱分离的效果。干柱色谱实际上只是制备型薄层色谱形式上的变化,具有相同的分辨能力。在使用混合溶剂系统进行干柱色谱分离时,可能达不到分析型薄层色谱所显示的分辨力,这时可在装柱前用 10% 的流动相对干柱的吸附剂进行预饱和。

在用洗脱液将干柱展开后,需要去除色谱柱的支撑物,其中最容易去除支撑物的是尼龙柱。根据展开的色带位置,可用刀将色谱柱或管切成若干段,然后把被分开的化合物用溶剂提取出来并进行过滤。尼龙柱的另外一个优点是可在紫外灯下观测到无色的色带,以此来指导切割。

填充剂是决定柱效的主要因素,填充剂的颗粒直径越小,直径范围越小,柱的效能越高。若填装均匀,分离的层带就会整齐,分离度也大。另外,若颗粒太小,流速减慢,则传质缓慢,同时移动相线速度减慢,引起纵向扩散,影响分离度。

Ai 等将丹参根的 95% 乙醇提取物用几种溶剂进行分配,对所得的一个部位(45 g)用 2.3kg 硅胶进行干柱色谱分离[洗脱剂为氯仿-甲醇-甲酸(85∶15∶1)]。把色谱柱切割成 16 段,每段吸附剂都用热甲醇洗脱。对第 13~14 段进一步用 Sephadex LH-20 纯化,得到 2.06g 丹参酚酸 B(salvianolic acid B)[27]。

3. 液-固色谱分离常用固定相

常用液-固色谱分离的固定相种类有多种,如硅胶、键合相硅胶、氧化铝、聚酰胺、葡聚糖凝胶、离子交换树脂等。上述各种固定相具有各自的特点,可选择用来分离不同类型的化合物。天然产物化学研究中往往需要采用不同的固定相进行多

次色谱分离得到纯化合物。下面简单介绍几种常用的固定相。

(1) 硅胶

硅胶是多孔性物质,可用通式 $SiO_2 \cdot xH_2O$ 表示。它具有多孔性的硅氧环(siloxane)及—Si—O—Si—的交链结构,其骨架表面的硅醇(silanol)基团能通过氢键与极性或不饱和分子相互作用。硅胶的吸附性能取决于硅胶中硅醇基的数目及含水量。随着水分的增加,吸附能力降低。若吸水量超过12%,吸附力极弱,不能用作吸附色谱,只可用作分配色谱的载体。硅胶的表面积、表面结构、微孔体积及微孔半径均直接影响色谱分离的效果。

有时可向硅胶中掺入某种试剂,以改良吸附性能,提高分离效果。通常,用硝酸银处理过的硅胶对不饱和烃类有极好的分离作用。改良吸附剂的制备一般是将含1%~10%填加试剂的水或丙酮溶液与硅胶混匀,待稍干后于110℃干燥即可。

正相硅胶色谱可选择的流动相种类相对较多,为得到好的分离效果,可选择具有一定比例的多种溶剂的混合物作为流动相。可借助于分析型硅胶薄层色谱来摸索分离条件,在实际色谱过程中也可采用从低极性逐步递增极性的梯度洗脱方式。

对硅胶吸附剂进行去活化可避免样品在色谱柱上被破坏[28]。如使用50~200μm的硅胶为吸附剂,每克硅胶可载样10~30mg。如欲达到过滤的目的,则可在进行硅胶色谱时上较多的样品。Verzele等在从挥发油中分离碳氢萜类及含氧萜类化合物时,每10g硅胶加入了1g挥发油样品[29]。

目前在大多数制备液相色谱分离中仍采用硅胶,优点在于硅胶价格低廉、分离速度快、可供选择的洗脱剂种类多,且所用大多数溶剂沸点较低、分离后易于除去。

(2) 键合相硅胶

硅胶表面的硅羟基能与正辛醇、氰乙醇及聚乙二醇等在一定温度下加热脱水后生成单分子键合固定相(Si—O—C型),与十八烷基三氯硅烷生成烷基化学键合相(Si—O—Si—C型)。另外,用 $SOCl_2$ 将硅胶表面氯化后,可与各种有机胺反应生成具有Si—O—Si≡N键的各种不同极性基团的化学键合相。这些键合相硅胶对化合物的分离具有不同的选择性,在液相色谱中占有重要地位,被普遍用于高效液相色谱。键合相硅胶具有许多优点,如可多次反复使用,样品被破坏的危险小,不可逆吸附少等。

在利用键合相硅胶进行反相色谱时,常用甲醇-水、乙醇-水或乙腈-水为洗脱剂。可用具有相同键合相硅胶的薄层色谱或分析型高压液相色谱进行制备型柱色谱的洗脱剂选择。

(3) 氧化铝

氧化铝是由氢氧化铝直接在高温(约600℃)下脱水制得。由于制造关系常带有微碱性,对于分离植物中的碱性成分如生物碱颇为理想,但不宜用于醛、酮、酯和内酯等类型化合物的分离,因为有时碱性氧化铝可与上述成分发生反应,如异构化

和氧化反应等。可用水洗除去氧化铝中的碱性杂质,再活化即得中性氧化铝。目前除了生物碱等碱性物质外,已很少用氧化铝作为固定相进行分离,基本上被硅胶所取代。

氧化铝的活性与含水量关系极大,一般在200℃左右加温4~6h活化,除去其中水分。若要降低活性,可加入一定量的水。活化时氧化铝表面的氧能与水分子结合形成羟基,具有离子交换性质,但温度不宜过高(<400℃);否则,会引起氧化铝晶格的改变,形成不可逆的吸附力下降,而不能供色谱用。

同硅胶色谱一样,在氧化铝色谱中,极性溶剂的洗脱能力较非极性溶剂大,所以逐步递增溶剂的极性,可使吸附在氧化铝柱上的不同化合物依极性大小依次洗脱,达到分离的目的。在实际操作中主要根据薄层色谱的展层来选择柱色谱洗脱剂。Arslanian 等利用碱性氧化铝为固定相,以乙醚-甲醇混合溶剂为洗脱剂,从 *Lupinus ergenteus*(Leguminosae)中分得生物碱(-)-argyrolobine[30]。徐任生等从植物胀果甘草中分离甘草查尔酮时,经多次探索,发现将甘草的氯仿提取物经聚酰胺柱分离后,再用氧化铝柱分离,氯仿洗脱,顺利得到结晶性产物[31]。

(4) 活性炭

活性炭色谱是用来分离水溶性物质的主要方法之一。对植物中的某些苷类、糖类及氨基酸等成分具有一定的分离效果。由于它来源容易,价格便宜,因此适用于大量制备型分离。

活性炭的吸附作用,在水溶液中最强,在有机溶剂中较弱,故用有机溶剂脱吸附。例如,以乙醇-水进行洗脱时,则随乙醇浓度的递增而洗脱力增加,有时也用稀甲醇、稀丙酮、稀乙酸溶液洗脱。

活性炭对芳香族化合物的吸附力大于对脂肪族化合物;对大分子化合物的吸附力大于对小分子化合物;对极性基团(如 COOH、NH_2、OH 等)多的化合物的吸附力大于对极性基团少的化合物。因此可以利用这些吸附性能的差别,将水溶性芳香族化合物与脂肪族化合物、氨基酸与肽、单糖与多糖分开。

使用前先应将活性炭于120℃加热4~5h,使所吸附的气体除去。使用过的活性炭可用稀酸、稀碱交替处理,然后水洗,加热活化。有时将粉末状活性炭制成颗粒状锦纶活性炭(1∶2)或与硅藻土(1∶1)混合后装柱,以增大流速,但颗粒状活性炭吸附性能要比粉末状活性炭低。方圣鼎等从垂盆草(*Sedum sarmentosum*)中分离水溶性垂盆草苷时,曾用颗粒状活性炭柱去除杂质,再反复进行硅胶柱色谱分离得到结晶[32]。

(5) 离子交换剂

离子交换剂是高分子化合物,具解离性离子交换基团,在水溶液中能与其他阳离子或阴离子起交换作用,而这种交换作用是可逆的。当两种以上的成分被"吸附"在离子交换剂上,用洗脱液洗脱时,它们的被洗脱能力取决于各物质洗脱反应

的平衡常数,利用物质“吸附”及脱“吸附”能力的不同进行分离即为离子交换色谱。目前大部分采用合成离子交换剂,一种是单体在聚合前本身就含有交换基团;另一种是首先形成聚合物,然后引进交换基团。其中用途最广的是离子交换树脂。另外,也有在纤维素或多聚糖上人工引入交换基所成的离子交换剂,它们大多用于植物大分子蛋白质、核酸、酶及多糖的分离精制。

离子交换树脂可分为两大类,即阳离子交换树脂与阴离子交换树脂(图 2－5)。

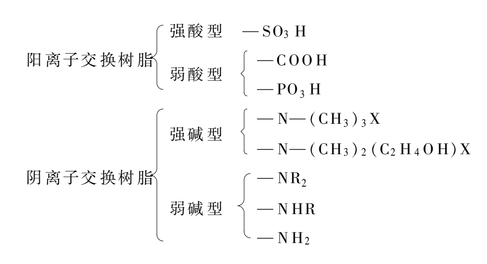


图 2－5　离子交换树脂分类

根据上述原理可采用不同型号的离子交换树脂,将植物中在水中具有一定溶解度的酸、碱与两性成分分开(图 2－6)。

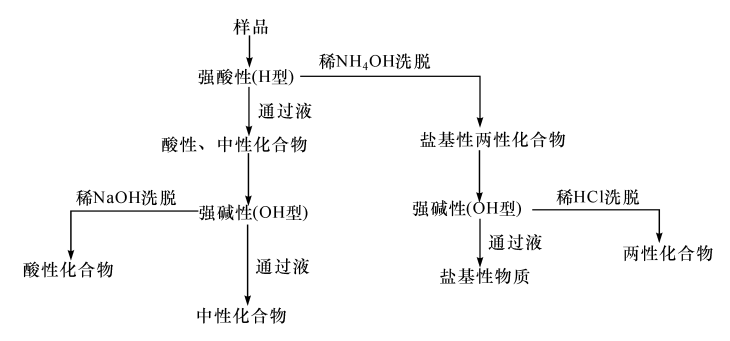


图 2－6　利用离子交换剂分离酸碱及两性成分

(6) 大孔吸附树脂色谱

大孔吸附树脂是一种不含交换基团的、具有大孔结构的高分子吸附剂,也是一种亲脂性物质。大孔树脂具有各种不同的表面性质,如疏水性的聚苯乙烯,可以有效地吸附具有不同化学性质的各种类型化合物。这种吸附的特点是解吸容易。当吸附过程是以亲脂键为主时,随着被吸附物的相对分子质量加大,吸附量也随着增加。吸附剂的表面积越大,吸附量越高。通常大孔吸附树脂的比表面可达 100~600m^2/g,具有吸附容量大的特点。但对一些有机分子,立体结构较大的化合物要考虑树脂的孔径,使分子能进入颗粒间隙。

大孔吸附树脂具有选择性好、机械强度高、再生处理方便、吸附速度快等优点,因此适用于从水溶液中分离低极性或非极性化合物,组分间极性差别越大,分离效果越好。混合组分在大孔树脂吸附后,一般依次用水,含水甲醇、乙醇或丙酮[10%,20%…(体积分数)]洗脱,最后用浓醇或丙酮洗脱。再生时用甲醇或乙醇浸泡洗涤即可,必要时可用 1mol/L 盐酸或氢氧化钠液依次浸泡,然后用蒸馏水洗涤至中性,浸泡在甲醇或乙醇中备用,使用前用蒸馏水洗涤除尽醇即可应用。

在分离的开始阶段,先将高极性样品通过聚合物担体可很好地除去其中的亲水性杂质(氨基酸、碳水化合物等)。通常的分离是先采用大孔树脂色谱,然后再进行硅胶色谱、反相色谱及凝胶过滤等[33]。Amberlite XAD-2 等型号树脂可吸附多酚类化合物,被用于黄酮类成分的分离[34]。在得到黄酮组分之后,可继续采用其他吸附剂进行分离,得到黄酮单体。

大孔吸附树脂在 20 世纪 70 年代末开始被应用于中草药化学成分的提取与分离,常用的型号有 D-101 型、DA-201 型、MD-05271 型、GDX-105 型、CAD-40 型、XAD-4 型和 D-型等。

金继曙等采用 DA-201 型大孔吸附树脂分离白芍总苷,收率为 1. 5%。该方法具有操作简便、树脂容易再生、得率恒定、产品质量稳定等特点[35]。

(7) 凝胶

凝胶色谱法是 20 世纪 60 年代发展起来的一种分离分析技术,使用的固定相是凝胶,它是具有许多孔隙的网状结构的固体,有分子筛的性质。当被分离物质的分子大小不同时,它们能够进入到凝胶内部的能力也不同。凝胶中的孔隙大小与分子大小有相仿的数量级。当混合物通过凝胶相时,比孔隙小的分子可以自由进入凝胶内部,而比孔隙大的分子就不能进入,因此在移动速度方面就发生了差异。大分子不被迟滞而随溶液走在前面,小分子则由于向孔隙内扩散或移动得到滞留,所以落后于大分子而得到分离 (图 2-7)。

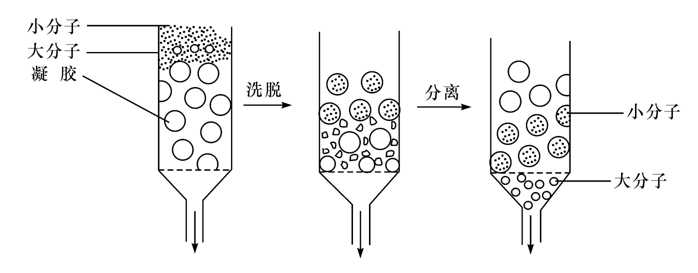


图 2-7　凝胶色谱分离示意图

从理论上讲,凝胶过滤柱是利用分子排阻效应来发挥分离效能。但当将凝胶

用于分离小分子时,溶剂-溶质-固定相之间的相互作用变得重要。凝胶可分为亲水性凝胶和疏水性凝胶。

1) 亲水性凝胶。目前最常用的亲水凝胶是交链葡聚糖凝胶,是由葡聚糖(右旋糖酐)和甘油基通过醚桥(—O—CH_2—CHOH—CH_2—O—)相交联而成的多孔性网状结构。交联结构直接影响凝胶网状结构中孔隙的大小,交联度越大,网状结构越紧密,孔隙越小,吸水时膨胀也越小。根据交联度的不同,所能分离成分的分子的大小也不同。交联度可用“吸水量”或“膨胀质量”来表示,即每克干凝胶所吸收的水分质量,用英文字母G代表葡聚糖凝胶,后面的阿拉伯数字表示凝胶的吸水量再乘以10的值。例如,G-25的吸水量为2.5mL/g。

2) 疏水性凝胶。在交联葡聚糖分子上引入一个基团增大其亲脂性,成为疏水性凝胶。如在Sephadex G-25上引入羟丙基基团成醚链的结合状态:R—OH ⟶ R—O—$CH_2CH_2CH_2OH$,即成为Sephadex LH-20,从而使它不仅具有亲水性能吸水,而且膨胀,这就扩大了它的应用范围,适用于难溶于水的亲脂性成分及水溶性成分的分离。目前,在植物小分子化学成分分离中常使用Sephadex LH-20。

一般来说,使用过的凝胶不需经任何处理即可反复再用。若加样处颜色较深,可将此部分挖掉。若整个柱体的凝胶颜色较深,可用0.2mol/L NaOH(内含0.5 mol/L NaCl)处理,再用水洗净。

Sephadex LH-20凝胶过滤不仅可作为一种有效的初步分离手段,还可被用于最后的分离工作,以除去最后微量的固体杂质、盐类或其他外来的物质。当纯化合物的量很少时,最好在分离的最后阶段使用Sephadex LH-20凝胶过滤法,原因之一在于它只导致极少的样品损失。

(8) 聚酰胺色谱

聚酰胺(polyamide)是通过酰胺基聚合而成的一类高分子化合物,分子中含有丰富的酰胺基,可与酚类、酸类、醌类、硝基化合物等形式氢键结合而被吸附,与不能形成氢键的化合物分离。

化合物分子中酚羟基数目越多,则吸附力越强。芳香核、共轭双键多的吸附力也大。容易形成分子内氢键的化合物,会使化合物的吸附力减少。从聚酰胺柱上洗脱被吸附的化合物是通过一种溶剂分子取代酚性化合物来完成的,即以一种新的氢键代替原有氢键的脱吸附而完成。如黄酮体苷元与苷的分离,当用稀醇作洗脱剂时,黄酮体苷比其苷元先洗脱下来,而非极性溶剂洗脱其结果恰恰相反,即黄酮体苷元比苷先洗脱下来,这表明聚酰胺具有“双重色谱”的性能,因聚酰胺分子中既有非极性的脂肪键,又有极性的酰胺基团。当用含水极性溶剂为流动相时,聚酰胺作为非极性固定相,其色谱行为类似反相分配色谱,所以黄酮体苷比苷元容易洗脱。当用非极性氯仿-甲醇为移动相时,聚酰胺则作为极性固定相,其色谱行为类似正相分配色谱,所以苷元比其苷容易洗脱。聚酰胺色谱除了上述化合物外也可

用于分离萜类、甾体、生物碱及糖类。

聚酰胺薄膜色谱是检出上述化合物的重要手段,它是将聚酰胺溶于甲酸中涂布在涤纶片基上所制成的膜片,待甲酸挥发干燥后即可使用。可用作聚酰胺柱色谱探索分离条件,又可检查柱色谱各流分的成分和纯度。若在各种溶剂系统中加入少量酸或碱,可克服色谱中拖尾现象,使斑点清晰。

(四) 逆流色谱

逆流色谱(counter-current chromatography)的分离原理是基于某一样品在两个互不混溶的溶剂之间的分配作用,溶质中的各个组分在通过两溶剂相的过程中按不同的分配系数得以分离。这是一种不用固态支撑体的全液态的色谱方法。逆流色谱是在逆流分溶法的基础上发展起来的,它具有混合物断续地分流和连续地分流两种方式。逆流分溶法的设备实际上是由数百个单元部件所组成,溶质在每一个单元的两个液相层之间进行分配,然后将其中的一层转移到下一个单元中去再分配。在逆流分溶法工作过程中,相层的转移之前必须充分实现平衡。逆流色谱是一个连续的非平衡过程。逆流色谱同液-固色谱技术相比可避免样品的不可逆吸附现象,并可避免样品因与某些固体固定相相互作用发生的破坏。

1. 液滴逆流色谱

液滴逆流色谱(droplet counter-current chromatography, DCCC)是在一组垂直排列的分离管内充满液态固定相,使移动相成液滴通过作为固定相的液柱,促使溶质在两相间连续分配(图 2-8)。使用时首先将移动相与固定相溶剂充分振摇平衡,然后分出重相(下层)及轻相(上层)。可以任选一相作为固定相,如果重相作为固定相,轻相作为移动相,称为上升法 (ascending method);反之,则称下降法(descending method)。当液滴通过分离管时,固定相在液滴和管壁之间形成薄膜,与液滴接触,同时不断形成新的表面,促进混合物中各组分能够反复地在两相之间分配,有利于分离的进行。这种方法所用的仪器比逆流分溶仪要轻巧简便得多,而且能避免乳化或泡沫的产生。此外,这种方法更加节省分离时间和减少溶剂消耗。用 DCCC 能一次分离毫克量级至克量级的混合样品,而且在实现分离的过程中物质不会损失。用内径是 3.4mm 的仪器已能一次分离高达 6.4g 的粗提物样品[36],采用内径是 10mm 的大内径管柱甚至能分离 16g 的样品[37]。

因为两相的极性差异很大,所以两相溶剂系统的选择对于合适的液滴的形成影响很大。有必要用三元的(或四元的)系统来制备两相溶剂,即用附加的第三种溶剂(或第四种溶剂)来调和其他溶剂组分和缓减原始两相的极性差异。其中一种最常用的溶剂系统是由 $CHCl_3$-MeOH-H_2O 组成的混合物。

DCCC 适用于极性天然产物,特别是酚类及糖苷的分离。在常规柱色谱分离

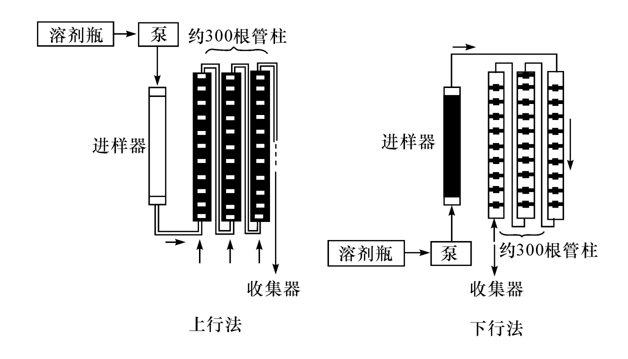


图 2－8 液滴逆流色谱分离示意图

过程中,多酚类组分的酸性羟基基团往往会在固定相物质上产生不可逆吸附,而 DCCC 方法则十分适合于分离这类组分。Mahran 等采用 DCCC 从植物 *Zizyphus spinachristi*(Rhamnaceae)的叶子中获得三萜皂苷,所用的溶剂系统是 $CHCl_3$-MeOH-*n*-PrOH-H_2O (9∶12∶1∶8)(下行方式)[38]。

同制备型 HPLC 相比,DCCC 消耗溶剂量较小,但分离时间过长,分辨率较低,且事前需要花较多时间选择合适的分离溶剂系统。随着离心分配色谱的应用,DCCC 的应用正日趋减少。

2. 离心分配色谱

逆流色谱有两种基本的原理模式:流体静力学平衡体系(HSES)和流体动力学平衡体系(HDES)。

前面介绍的 DCCC 是靠重力作用的,其缺点是洗脱速度不可能提高,一般的分离过程要花两天或更长的时间。这种逆流色谱体系的管柱中只有 50 % 的空间是能形成两相相互混合的有效空间。更有效地利用管柱空间的方法是在移动相流通时使管柱转动起来,使得两相之间迅速建立起流体动力学平衡。这样,能在接近 100% 的管系空间里形成两相之间的混合。用移动相或固定相或两相的混合液溶解样品,把它从进样器注入管系,它就会按各组分的分配系数在两相之间进行分配。因为没有用固态支撑体,溶质的保留时间只取决于其分配系数值。这类装置都具有作用于两相溶剂系统的离心力,所以把这一技术称为离心分配色谱(centrifugal partition chromatography,CPC),比称为逆流色谱更准确些。

目前,已有一些商品化的离心分配色谱仪器问世,根据原理模式的不同,可将其分为流体动力学平衡系统(HDES)和流体静力学平衡系统(HSES),这里对主要的一些做简要描述。

(1) HDES

HDES 中,管柱绕离心仪的中轴线公转,同时以一定的角速度绕自身轴线自转(图 2-9),这样的运动导致两溶剂相的剧烈混扰,反复混合和分层,这对溶质的分配分离极为理想,其分配转移的频率高达每秒 13 次以上,此技术能用很小量的溶剂就能实现快速有效的分离作用[39]。这一技术已经以高速逆流色谱(HSCCC)的名称流传于世。这种很实用的仪器能在几小时之内分离若干克的样品。

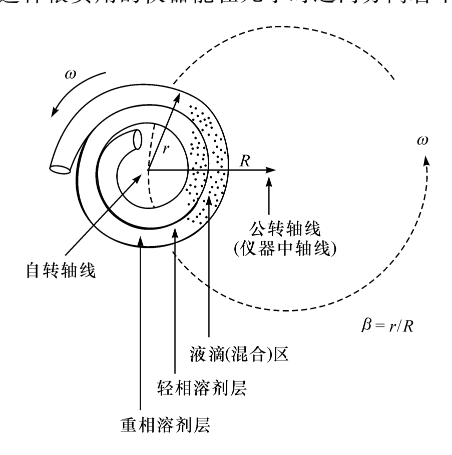


图 2-9　高速逆流色谱仪(ω = 转动速度)

(2) HSES

HSES 不同于前述的 HDES,它的管柱单元固定在离心机中,没有自转,只有一根公转的轴。

根据分离装置的形状,常见的有:

1) 柱体式仪器。日本 Sanki Engineering 公司的 Murayama 等在 1982 年著文介绍了这种色谱仪器[40]。在原始的仪器中,分离柱实际上是一些小柱体。这些柱体分布在离心仪转子的周围,它们的纵轴同离心力的方向平行,彼此间用细小孔径的管子相连接(图 2-10)。先在这样的管柱柱体里注满固定相,然后让转子转动的同时泵入移动相,使移动相进分离柱形成一串液滴并穿过固定相。Berthod 和 Armstrong 对这种柱体式仪器的不同参数进行过研究,仪器的高转速能提高色谱峰的分辨度[41]。要想达到好的分离效果只能在移动相洗脱过程中使固定相的流失不超过 20%~ 30%,为了满足这一条件,必须慎重地选择转子的转速和泵的压力。此外,移动相流速的增高也能提高分离效率。

2) 盘式仪器。盘式仪器是 1992 年诞生的,最初的仪器在离心机中由两个单元组成,每个单元包含 6 个圆盘,每个盘有 89 个通道。两个盘组的总容积约是

220mL。日本 Sanki Engineering 公司生产该类产品。

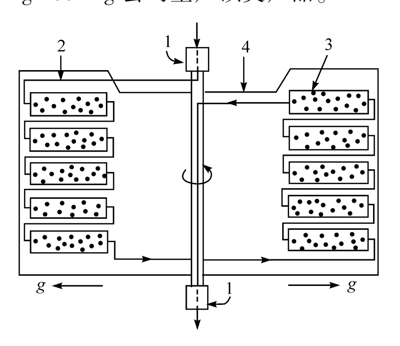


图 2-10 Sanki Engineering 公司制造的柱体离心色谱仪

1. 旋转密封接头；2. 连接管；3. 分离柱管；4. 转子；*g*. 离心力

正确地选择溶剂系统对于 CPC 分离的成功是关键。最有效的溶剂组合应是样品在其中的分配系数为 0.2~5，最好是接近 1。同时，使两相的分层时间尽可能短也很重要。对于 HSCCC 来说，分层时间应短于 30s[42]。如果选定的溶剂系统的上相和下相的体积相近也是有好处的。

目前，CPC 已经作为常规制备型分离技术在天然产物领域用于粗提物和半纯化流分的分离，一次分离样品的量是几毫克至几克。CPC 也被开发作为提取技术，即从大体积溶液中快速浓缩出其中的痕量组分。例如，用溶解了某组分的大量溶液作为移动相，而用对于此组分亲和力强的溶剂作为固定相，以实现有效的浓缩和提取。

银杏 *Gingko biloba* (银杏科)叶的提取物作为治疗脑循环障碍等某些老年病症的药品在全球被广泛使用。可以结合应用 CPC 和半制备 HPLC 技术从银杏叶中分离黄酮苷类组分。其中液-液分离步骤采用梯度洗脱方式，用水作固定相，先用乙酸乙酯进行洗脱，然后逐渐在乙酸乙酯中加入异丁醇，直至乙酸乙酯-异丁醇的比例达到 3∶2 为止。通过分离，能从 500mg 银杏叶提取物中分离出七种黄酮醇苷[43]。

CPC 技术具有分离速度快、分辨能力高、样品载量大及溶剂消耗量小的特点。当然，CPC 还不能成为制备级 HPLC 的竞争对手，但当遇到用其他色谱技术不能解决的样品分离问题时，不妨试用选择特性不同的 CPC 技术来予以解决。

三、结语

要从含有复杂成分的植物提取物中分离出一种生物活性成分是一项耗时的工作，可能要采用许多的分离步骤。配合使用各种色谱技术是解决问题的最佳途径。

在确定一种分离策略时，挑选一些选择性差别尽可能大的方法通常是有益的。如果在分离全过程中只用一种固定相，则可通过变换洗脱剂条件来最大限度地增加其选择性。随着分离的进行，操作规模会不断减小。这是因为产物纯度的不断提高，相应地导致样品量减少。这也意味着开始采用的分离步骤应能分离较大量的样品，如采用相对便宜的固定相（硅胶、聚酰胺、大孔树脂或离子交换树脂）进行的柱色谱、快速色谱或逆流色谱等。对接下来的少量样品的色谱分离可采用稍昂贵一些的柱填料及仪器。通过合理地选择分离方法可以有效地提高工作效率，避免样品的损耗。

参　考　书　目

[1] 徐任生，陈仲良．中草药有效成分的提取和分离（第二版）．上海：上海科学技术出版社，1983

[2] 中国医学科学院药物研究所．中草药化学成分的研究．北京：人民卫生出版社，1980

[3] Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M．制备色谱技术在天然产物分离中的应用．赵维民，张天佑译．北京：科学出版社，2000

[4] 姚新生．天然药物化学．北京：人民卫生出版社，1998

[5] 林启寿．中草药成分化学．北京：科学出版社，1977

[6] 徐任生，叶阳，赵维民．天然产物化学（第二版）．北京：科学出版社，2004

参　考　文　献

[1] McHugh M et al. Supercritical Extraction: Principles and Practice. Boston: Butterworth, 1986

[2] Westwood S A. Supercritical Fluid Extraction and Its Use in Chromatographic Sample Preparation. New York: Chapman and Hall, 1993

[3] 李飘英等．天然产物研究与开发，1992，4:30

[4] 唐宗俭等．中国科学，1974，6:15

[5] Hakala S H et al. J Agric Food Chem, 1994, 42:1314

[6] Pettit G R et al. J Med Chem, 1995, 38:1666

[7] Gustafson K R et al. J Med Chem, 1992, 35:1978

[8] Rupprecht J K et al. J Nat Prod, 1990, 53:237

[9] 徐任生．天然产物化学．北京：科学出版社，1993，504

[10] De Bernardi M et al. J Chromatogr, 1984, 284:269

[11] Elliger C A et al. J Chem Soc Perkin Trans I, 1990, 525

[12] Zheng G Q. Planta Med, 1994, 60:54

[13] Tan G T et al. J Nat Prod, 1991, 54:143

[14] Nyiredy S Z. Anal Chim Acta, 1990, 236:83

[15] Erdelmeier C A J et al. Phytochem Anal, 1991, 2:3

[16] Still W C et al. J Org Chem, 1978, 43:2923

[17] Nakatani M et al. Phytochemistry, 1994, 36:39
[18] Zhao W et al. J Nat Prod, 1994, 57:1613
[19] Schaufelberger D et al. J Chromatogr, 1985, 346:396
[20] Zogg G C et al. Chromatographia, 1989, 27:591
[21] Zogg G C et al. J Liq Chromatogr, 1989, 12:2049
[22] Snyder L R et al. Introduction to Modern Liquid Chromatography(2nd ed). New York: John Wiley, 1979
[23] Slimestad R et al. J Chromatogr A, 1996, 719:438
[24] Govindachari T R et al. J Liq Chromatogr, 1996, 19:1729
[25] Suzuki H et al. Phytochemistry, 1994, 37:591
[26] Zarate R et al. J Chromatogr, 1992, 609:407
[27] Ai C et al. J Nat Prod, 1988, 51:145
[28] Bruno M et al. Phytochemistry, 1996, 42:1059
[29] Verzele M et al. J Chromatogr Sci, 1980, 18:559
[30] Arslanian R L et al. J Org Chem, 1990, 55:1204
[31] 徐任生等. 化学学报, 1979, 37:289
[32] 方圣鼎等. 化学学报, 1962, 40:273
[33] Mizui F et al. Chem Pharm Bull, 1990, 38:375
[34] Rosler K H et al. J Nat Prod, 1984, 47:188
[35] 金继曙等. 中国中药杂志, 1994, 1:31
[36] Hostettmann K et al. Nat Prod Rep, 1984, 1:471
[37] Komori T et al. Liebigs Ann, 1983, 2092
[38] Mahran G E H et al. Planta Med, 1996, 62:163
[39] Ito Y. J Chromatogr, 1984, 301:377
[40] Murayama W et al. J Chromatogr, 1982, 239:643
[41] Berthod A et al. J Liq Chromatogr, 1988, 11:547
[42] Oka F et al. J Chromatogr, 1991, 538:99
[43] Vanhaelen M et al. J Liq Chromatogr, 1988, 11:2969

第三章　结构研究中常用的波谱技术

第一节　核磁共振谱

一、引言

二维核磁共振(2D-NMR)波谱技术对天然产物结构测定的方式已产生了巨大的影响。以往天然产物的结构测定是以积累、渐进的方式进行的,即依赖于前人积累的天然产物知识库。要确定一个具有全新骨架的天然化合物的结构是十分不容易的,往往要通过理化性质测定、波谱数据、化学降解、化学转换、半合成、全合成或晶体结构等手段,经过数月,乃至数年的努力才能完成。后人进行某种天然产物的结构研究往往是先要查阅文献,收集有关该生物资源已知代谢产物的信息。然后,对分离纯化得到的化合物通过测定理化性质或进行点滴反应,判断其属于何种化合物类型,再进一步通过波谱数据判断与已知天然化合物库中某个化合物的结构差异,或通过化学变换与已知结构的天然化合物相关联等方法才能确定其结构。至 20 世纪 80 年代,随着 2D-NMR 波谱技术的发展,有可能对组成分子的^{1}H、^{13}C和^{15}N等核的性质以及它们之间的连接关系进行详尽的研究,并通过对这些核性质及其连接关系的解析,对天然化合物的结构进行系统的、从头开始(*ab initio*)的结构解析。因此,自从那时以来,天然产物的结构研究进入了跃进式发展的阶段:具有新颖构造的天然化合物的结构测定往往只要数周乃至数日就能完成,具有全新骨架的天然化合物层出不穷。当然,这样说并非是要否定天然产物的化学变换、半合成和全合成研究的重要性。相反,由于天然产物化学研究的根本目的是要了解它们的化学性质和功能,并在此基础上改造其结构和功能,创制具有更好功能的新物质,因此天然产物的化学变换、半合成和全合成研究是极其重要的、无可替代的。但是,天然产物结构系统测定方法的出现由于免除了对化学变换的依赖,使以往无法鉴定的、结构新颖的、微量天然化合物(结构新颖的天然化合物往往是微量的)的结构测定成为可能,结构新颖的天然化合物结构测定的时间大大缩短,反过来为天然化合物的半合成和全合成提供了新颖目标分子和合成方法的挑战。因此,二者是目标一致的、相辅相成的。

近年来,几乎所有化学,药物化学,生物化学和其他相关专业的学生都学习如何用核磁共振(NMR)波谱去鉴定化合物的结构。尽管在许多有关 NMR 波谱的教科书和专著中已有这一领域各种新、老技术物理背景以及 NMR 参数与化学结构关系的详细介绍。但是,有关采用 NMR 波谱技术测定化合物结构的 know-how,即根据

NMR 数据推导和解析分子结构的策略、技术和方法学的介绍尚不多见。

另外,近年来许多从事天然化合物结构测定和合成的硕士和博士研究生论文提供了大量采用 NMR 这个强大的手段成功地进行结构解析的例子。本书在多年研究与教学的基础上,为大学生、研究生提供一个比较系统的、易懂的运用 NMR 波谱测定结构的方法介绍。对于一些在其他教科书、专著中已有详细介绍的专业名词、技术参数和实验方法(如化学位移、自旋-自旋偶合、偶合常数、信号多重度、一次或高阶谱图、化学和磁等价、连续波和傅里叶变换 NMR 谱、自旋去偶、NOE 效应以及弛豫和弛豫时间等)这里不再重复,而把重点放在介绍采用一维和二维 NMR 波谱进行结构解析策略和战术思想的运用和以这些策略为基础的天然产物结构的系统解析方法,希望对这一领域的后来者有所帮助。

二、2D-NMR 波谱技术

2D-NMR 起源于傅里叶变换的概念,即在时间范畴测得的 NMR 信号通过傅里叶变换就能得到频率范畴的 NMR 谱。如果把这个概念扩展到有两个时间变量的实验,通过傅里叶变换就能得二维频率的 NMR 谱(2D-NMR)。2D-NMR 与 1D-NMR 一样,都是探测核的磁化矢量在磁场中进动时的相互间的相干作用。这种相干作用有两种:一种是通过共价键的标量偶合;另一种是通过空间的偶极相互作用,又叫 NOE 效应。检测通过化学键的标量相互偶合就能建立核与核通过化学键的连接关系,如果检测的是同种核间的偶合作用,得到的就叫做同核相关谱(homonuclear correlation spectroscopy, COSY),最常用的就是 H,H-COSY。如果检测的是异种核之间的偶合关系,得到的就叫异核相关谱(heteronuclear correlation spectroscopy)最常用的是 C,H-COSY。因此,通过这些偶合相关信号的测定就能确定分子的共价键连接图式(即平面结构)。另外,探测核与核之间通过空间的偶极相互作用(NOE 效应),就能建立核与核通过空间的连接关系以及原子在空间的配置关系。显然,前者能够补充有关分子平面结构的信息,而后者能够提供有关分子的立体化学的信息,是研究分子构型、构象和分子运动性的重要工具。近年来,已有许多 2D-NMR 波谱的专业书刊和评论,对各种 2D-NMR 的原理、实验技术、解析方法和应用范围做了详尽的介绍,可供读者参考[1~9]。

要了解为什么 2D-NMR 特别适宜解决新颖有机分子的结构问题,最好先考虑一下天然产物结构测定的过程,它大体上可以分为三个阶段:

1) 第一阶段是收集关于化合物最原始的信息(化学的、谱学的和生物来源方面的信息),包括相对分子质量、分子式,特别是特定原子、官能团、发色团的存在及分子不饱和度等。

2) 第二阶段是提出未知物的可能结构或后补结构。化学家一般把第一阶段得到的分子中官能团、片断和部分结构通过运用种种约束条件连接起来。这个过

程需要发挥洞察力和想像力。但是,做出的判断往往是较为主观偏颇的,有时是相当危险的。因此,这一步是结构解析中最为困难的步骤。

3) 第三阶段就是尝试用后补结构去解释或归属所有能得到的波谱数据,并且如果必要的话,进行新的实验,包括详尽的波谱研究或化学实验去解析或验证候补结构。

当然对于某些极为复杂的天然产物,结构不可能由这么简单的步骤就能产生,常常还要进行降解而得到分子片断或部分构造,每一个片断或部分构造又作为一个新的未知物进行结构解析,最后把各个片断的结构综合起来,得到该化合物的完整结构。此外,在处理真正复杂的结构问题时,这三个阶段并非是孤立地进行的,而是相互交叉、重叠的。后补结构可能出现在整个过程的一开始,而且候补结构常常不止一个。随着积累的数据越来越多,要不断加以修正和否定,最终才能得到唯一正确的结构。但是,这三个阶段确实是代表了结构测定本质的某些方面。

那么为什么 2D-NMR 对于结构解析特别成功呢?传统的 NMR 方法测定结构主要借助于化学位移 δ,它包含有核化学环境的直接信息。在 NMR 技术应用的早期阶段是特别强调 δ 的重要性,常常把从未知物观测到的 δ 值与某一结构的标准数据,通过表或经验规则加以比较,并以此做出推测或判断。但是,如果仅仅利用化学位移的信息进行结构解析,这一技术就失去了其真正的价值。在天然产物的结构解析中,δ 并不是 NMR 最重要的性质,因为它只是在结构解析的第一、第三阶段发挥作用(表明某些结构单元的存在,通过与已知结构的数据相比较以判断是否相符),而对于结构测定的第二个阶段(片断或部分构造的装配)则没有明显的贡献。

但是 NMR 技术确实包含有能解决第二阶段难题的信息,并且 NMR 在这方面是特别富有信息的。2D-NMR 方法用于结构解析第二阶段的优势在于:它们能够提供组成分子的各种核之间的相关(correlation)与连接(connectivity)信息。如前所述,几乎所有的 2D-NMR 实验都包含核与核之间的相关,不管是同核偶合、异核偶合、NOE,还是别的什么相关,都能够通过它们把分子片段直接地、毫不含糊地连接起来,通过分子片段的组装就能够直接得到后补结构。

当然,2D-NMR 方法对结构测定的第三阶段也能做出重要的贡献。因为排除后补结构、确立正确结构的过程是通过 NMR 共振信号的完全归属而实现的,而这种 NMR 共振信号的完全归属能够在解析 2D-NMR 谱波数据的过程中自然而然地得到。

(一) 最基本的 2D-NMR 实验方法

1. H,H-COSY(质子间孪生、邻位和远程偶合相关)

COSY 是 correlation spectroscopy 的简称。H,H-COSY 是一种最简单的二维 NMR 实验,它关联分子中偶合质子的化学位移。在此二维谱中,两个频率轴都以质子的化学位移作图,因此谱图是方形对称的。其一维^{1}H-NMR谱的投影出现于对角线上(称对角峰或对角信号)。对角线以外信号称交叉峰或相关信号,它们处于^{1}H 1D-NMR 信号的水平和垂直连线的交叉点上,表明对应的两个质子间相互自旋偶合。因此,H,H-COSY 谱图揭示的是质子与质子间的自旋偶合关系。它在结构测定中可以替代自旋去偶实验,快速确定分子中质子与质子间通过化学键的偶合关系,包括质子间孪生($^{2}J_{HH}$)、邻位($^{3}J_{HH}$)或远程如烯丙位和 W 形($^{4}J_{HH}$)的偶合。

H,H-COSY 谱图可按堆笺作图,显示为三维图形,信号强度以峰高表达在第三维。这种表达方式由于透视关系,容易产生信号畸变和重叠,也不便于作图和分析,实际使用中很少采用。另外一种形式是等高线作图,信号强度以一系列同心圆表示,有些类似于军事地图。等高线作图显示明了,有利于谱图分析。但是截面高度的选择可能会影响其提供的信息,截面选择过高,相关信号就弱甚至消失,如果截面选择过低,就会出现假峰和噪声信号,干扰正常的谱图分析。实用中常常选择适当的等高线作图,以得到包含最多的结构信息和最少的噪声的谱图,或以不同等高线分别作图,得到多个谱图,相互参考以得到更多的信息,并辨别和剔除假峰和噪声信号。

H,H-COSY 技术也有限制:①因为交叉峰的截面图可能并未揭示所包含的偶合是属于孪生($^{2}J_{HH}$)、相邻($^{3}J_{HH}$)或 W 形($^{4}J_{HH}$)偶合中的哪一种,如果不考虑化学位移和可能的偶合常数,解析就不一定能够得到结论性的论点;②谱中重叠的信号无法用 H,H-COSY 分离。但是,如果采用后面要讨论的相敏的双量子滤波的 H,H-COSY 谱,谱图的数据分辨率又足够高,交叉峰的多重度的精细结构就能加以识别,上述限制就能很大程度上得到克服。

H,H-COSY 谱图揭示的是质子间孪生、相邻或远程(W 形和烯丙位)质子间的标量偶合,因此提供的是分子中原子与原子间通过键的连接(connectivity through bond)。它们能够分别提供分子内 $CH_{A}H_{B}$($^{2}J_{HH}$)、CH—CH($^{3}J_{HH}$)和 CH—C—CH 或 CH ═C—CH($^{4}J_{HH}$)结构片断的信息。尽管存在着种种限制,由于其灵敏度高,结构信息丰富,通过解析 H,H-COSY 方法,接 H 碳骨架结构片断总能够得到解析,加上从其他二维 NMR 实验得到的互补信息,就得到完整的分子结构。因此,H,H-COSY 不失为最为有效、最常用的二维 NMR 方法。

2. H,H-NOESY

检测 H,H-COSY 相关的脉冲序列也可以改变为检测质子间偶极相互作用(即 NOE),这样 H,H-COSY 序列就转变为 H,H-NOESY 序列,得到的就是 NOE 信号强度的二维变化。NOESY 谱与 H,H-COSY 谱相似,是方形的。对角线上有对角峰,对角线外显示相关峰。但是相关峰揭示的是质子与质子间在空间的相互接近关系,而非质子与质子通过键的标量偶合。NOESY 谱在天然产物的结构解析中有两方面的功能。首先,利用 NOESY 谱提供的相关信息,也可以把分子中的原子或片断构造连接起来,这种连接称为通过空间的连接(connectivity through space)。当用 H,H-COSY 谱进行结构解析遇到困难的时候(如相邻质子间二面角接近 90°,偶合常数接近于零或受季碳原子阻隔),NOESY 谱常常能够提供有用的信息。因此,在天然产物平面结构的解析中,通过空间的连接是对通过键的连接的有力补充。NOESY 谱更重要的功能是能够通过分子内原子与原子在空间上的相互配置关系,提供有关分子相对立体化学和溶液构象方面的重要信息,是研究分子构型、构象和运动性的重要工具。与前文提到的 NOE 差谱相比,NOESY 谱揭示分子内所有的质子与质子间的通过空间的相互接近,因此效率比较高,特别适宜于具有复杂结构的天然产物分子或生物大分子的研究。此外, NOE 差谱实验一般要求样品进行脱氧处理,才能得到好的结果,而 NOESY 实验的样品一般不必进行脱氧处理。

3. C,H-COSY

C,H-COSY 通过单键 CH 偶合常数 $^{1}J_{CH}$ 把一维频率轴上的 ^{13}C 化学位移与另一维频率轴上的 ^{1}H 化学位移关联起来。所用的脉冲序列包含 ^{1}H-^{13}C 极化转移,可提高灵敏度 4 倍。因此,C,H-COSY 一般并不需要比宽带去偶 ^{13}C-NMR 谱更多的样品。在二维 C,H 相关谱图中,^{13}C 化学位移出现在 x 轴,^{1}H 化学位移出现在 y 轴,交叉峰出现在相应的 ^{13}C 和 ^{1}H 信号的垂直和水平连线的交叉点上。提示相应的 ^{1}H 和 ^{13}C 核是通过 $^{1}J_{CH}$ 相互关联的。由于两个轴的频率不同,所以 C,H-COSY 谱图中不出现对角峰。C,H-COSY 谱图的解析十分简单明了,但是所提供的信息非常可贵。首先,它能够提供 C、H 之间通过键的直接连接($^{1}J_{CH}$),清楚地告诉你在一个 C 原子上连接几个 H 原子,提供了 C 共振信号的多重度的信息。同时揭示出哪个 H 原子连接在哪个 C 原子上,为把质子与质子间的偶合相关信息转变成为 C 原子与 C 原子的连接提供了基础。不仅如此,在具有多环体系的复杂天然产物分子中,一些环上的 CH_2 结构单元其两个质子常常是磁不等价的。这种孪生质子间的 $^{2}J_{HH}$ 偶合与相邻质子间的 $^{3}J_{HH}$ 偶合混杂在一起,往往干扰质子偶合体系的分析。C,H-COSY 谱对非等价孪生质子的鉴定提供了有效的手段。此外,由于

^{13}C-NMR信号具有比^{1}H-NMR信号化学位移散布宽的特点,一些在 1D ^{1}H-NMR谱图中十分拥挤的区域中的质子信号在 C,H-COSY 谱中随化学位移分布极宽^{13}C-NMR信号而散布开来,大大简化了^{1}H-NMR信号的解析。这对于结构十分复杂的天然产物的结构解析和生物大分子溶液三维结构的计算十分有利。还可以采用谱图编辑的手法,选择在相应的^{13}C-NMR信号的位置作截面,得到相应的^{1}H-NMR截面图,如果分辨率足够高,甚至可以从截面图得到相应质子信号多重度的精细结构信息。

4. C,H-COLOC(孪生和相邻的 CH 相关)

C,H-COSY 实验提供了 C,H 通过$^{1}J_{CH}$偶合的连接,因此它只适用于解析接 H 的 C 原子,而不适用于解析不接 H 的季碳原子。但是,C,H-COSY 实验的一个变种也可适用于解析季碳原子。就是在 C,H-COSY 实验中把探测的 C,H 偶合常数调节到相当于$^{2}J_{CH}$和$^{3}J_{CH}$的比较小的数值(2~ 25Hz),这个实验简称为 C,H-COLOC(CH correlation via long-range coupling)。这种二维 C,H 相关谱检测 C,H 通过二键($^{2}J_{CH}$,孪生偶合相关)或三键($^{3}J_{CH}$,相邻偶合相关)的连接关系,同时抑制 C,H 间通过一键($^{1}J_{CH}$)的偶合相关。这种谱图的图形和解析方法与 C,H-COSY 十分类似,但是谱图中的交叉峰揭示的不是 C,H 之间隔一键($^{1}J_{CH}$)的连接,而是隔二键或三键($^{2}J_{CH}$和$^{3}J_{CH}$)的连接关系。C,H-COLOC 谱图中对应于季碳原子化学位移的交叉峰提示出与该季碳原子相连接的分子部分构造的信息,如下所示

$$—C_1H—C_2^*—C_3H—$$

式中:C^*为季碳原子,如果 H_1 显示与 C_2^* 和 C_3 的交叉峰或 H_3 显示与 C_1 和 C_2^* 的交叉峰,可以借此把 C_1、C_2^* 和 C_3 三个 C 原子依次连接起来。因此,这个实验的实质是提供了 C 原子与 C 原子之间的连接。由于接 H 的 C 原子之间的连接可以通过 H,H-COSY(H 与 H 间的偶合)加上 C,H-COSY(C 与 H 间的偶合)得到,所以 COLOC 实验补充了把季碳原子接入分子骨架的手段,或者说透过季碳原子 C_2^* 把两侧的质子偶合链连接起来的手段,因此,是十分可贵的。

不仅如此, COLOC 实验还为把杂原子 X(X = O,S,N 等)接入分子骨架提供了依据,如下所示

$$—C_1H—X—C_2H—$$

C_1 与 C_2 通过杂原子相互连接,H_1 与 H_2 之间没有直接偶合关系,分子的两个片断无法连接起来。如果 COLOC 实验中显示 H_1 与 C_2 或 H_2 与 C_1 隔三键($^{3}J_{CH}$)的偶合相关峰,我们就可以把—C_1—X—C_2—三个原子连接起来,而且,如果 C_1 与 C_2 中任何一个为季碳原子,这种偶合关系也同样适用。类似地,这里检测到的隔三键($^{3}J_{CH}$)的偶合相关峰实质上提供了 C 原子与杂原子之间的连接。其

中有关杂原子种类的信息可以从 C_1 和 C_2 两个 C 信号的化学位移以及分子式等方面得到。

这个方法还可以用于更复杂的情况，如两个季碳原子相邻和季碳原子与杂原子相邻。如下所示

$$—C_1H—C_2^*—C_3^*—C_4H—$$

$$—C_1H—X—C_2^*—C_3H—$$

测定其 COLOC 波谱，如果 H_1 显示与 C_2^*、C_3^* 的隔二键和隔三键的相关峰，或 H_4 显示与 C_3^*、C_2^* 的隔二键和隔三键的相关峰，就可以把 C_2^*、C_3^* 两个季碳原子接入复杂骨架。C_2^*、C_3^* 两个信号的归属可分别由更远隔的 H 原子与它们的隔三键（$^3J_{CH}$）相关峰而确认。对于第二种情况，类似地，如果 H_1 显示与 C_2^* 的隔三键的相关峰，同时 H_3 显示与 C_2^* 的隔二键的相关峰，就可以把 X 和季碳原子 C_2^* 接入分子骨架。其中杂原子的位置可由 C_1 和 C_2^* 的化学位移来判别。

充分利用 2D-NMR 提供的 C，H 隔二键（$^2J_{CH}$，孪生偶合相关）和三键（$^3J_{CH}$，邻位偶合相关）的连接关系，把分子中被季碳原子或杂原子隔断的部分构造连接起来是采用近代 2D-NMR 技术解析天然产物结构的核心内容，也是结构解析取得成功的关键之一。

综上所述，把 1D-NMR 扩展为 2D-NMR 提供了许多优越性：①几乎所有的 2D-NMR 实验都包含有相关（同核偶合、异核偶合、NOE 或其他），这些相关信息（correlation）为结构解析的第二阶段，原子或部分构造的连接（connectivity）提供了有力的手段，即通过键的连接和通过空间的连接。因此利用 2D-NMR 谱提供的相关信息就能直接地、毫不含糊地把分子的原子或分子片段拼接起来，从而大大提高了解析未知结构的能力。此外，相关信息的解析过程就是连接的过程，也是信号归属的过程。解析过程直观明了，严谨而富于逻辑性，这些构成了 2D-NMR 结构解析的策略基础。②2D-NMR 大大提高了信号的分解能力，使在 1D 谱中相互重叠的信号通过展开为 2D 而得到进一步的分离。如果谱图分辨率足够高，还可以通过谱图编辑（如作截面图），进一步得到参与偶合相关的核磁共振信号的精细结构。③为共振信号的归属提供了有力的手段，共振信号相关的解析过程也就是波谱数据的归属过程，通过这种解析也就同时完成了数据的归属，而共振信号的完全归属是进一步讨论分子的立体化学（包括溶液构象）、研究分子运动性和分子间相互作用的基础。总之，2D-NMR 与 1D-NMR 虽然都是探测分子中核与核在磁场中磁矢量进动的相干关系，但 2D 方法是以更一般、更有效、更富有信息的方法来完成这种探测的，因此能提供许多用 1D-NMR 方法难以得到的结构信息。

不仅如此，2D-NMR 测定中还可以通过改变实验参数，得到所希望的结构信息。例如，在测定的卷积期和检测期增加一定的时间延迟，得到延迟 COSY 谱（delayed COSY），从而可以探测到分子中远程偶合关系（^4J_H 和 ^5J_H），对烯丙位、W 形

等远程偶合的检测十分有利。如果在 C,H-COSY 测定中也设置这种时间延迟,便可测得远程异核相关谱(long range C, H-COSY,如前述的 COLOC 实验)。如果把测定中的 90°检测脉冲改变为 45°,就能得到 β-COSY 谱(又叫做 COSY-45),从该谱图中交叉峰的图形可以决定偶合常数的符号并进一步推断偶合为 ^2J_H 还是 ^3J_H。此外,在测定中通过相位循环方法可以得到包含有相位信息的相敏 COSY 谱,该谱图中的交叉峰会显示出精细裂分的图形,从而得到参与偶合的质子的信号裂分形态信息。20 年来,受生物医药领域阐明生物大分子结构和寻求新颖生物活性分子的驱动,波谱学界做出了巨大的努力,新的脉冲序列如雨后春笋般地出现,新的实验方法层出不穷。其中相当一部分新的脉冲序列和实验是对上述基本的 2D-NMR 方法的改良,或提高灵敏度,或增加特异性,或通过利用谱仪硬件的新发展使原本很难完成的实验变得较为容易,使原本检测效率较低的信息高效地检测,使原本难以得到的信息变得容易得到。以下介绍一些与复杂天然产物结构解析相关的 2D-NMR 新技术。

(二) 改良的 2D-NMR 实验方法

如前所述,除了通过上述基本的 2D-NMR 实验(同核和异核位移相关谱)进行分子片段连接和信号归属可之外,还有许多其他的实验方法来微调所能获得的信息,以解决特定的结构问题。此外,要得到一种特定的结构信息,常常有多种 2D-NMR 方法。因此,虽然直接相关实验是首选的方法,还有许多变通方法可供采用,应该选择的最佳 2D-NMR 方法去解决你所要解决的具体结构问题。以下介绍几种在新颖天然产物结构测定中最重要、应用最普遍的 2D-NMR 改良实验方法。

1. 多量子相干测定方法的发展

按照量子力学的原理,核的磁化相干作用不仅有单量子的也有多量子的。原则上多量子跃迁是禁止的,但可以通过脉冲序列来激励,最后调制在单量子上进行检测。随着各种复杂而先进的脉冲射频技术的发展,激发某些通常情况下极为微弱的多量子磁化相干跃迁已成为可能。应用得较为普遍的是双量子滤波技术,通过在卷积期和检测期选择双量子相干转移(double quanta coherence transfer)进行双量子滤波(double quanta filter)能压制或除去某些不需要的信号,强调或突出某些需要的信息。例如,COSY 实验采用双量子滤波,就成为双量子滤波的相关谱(DQF-COSY)[10~12]。

(1) DQF-COSY

DQF-COSY 的显著特点是:①它的所有峰都是吸收型的,谱图比较清晰、干净,不像普通 COSY 谱的对角峰是发散型的;②所有的相关峰都有精细结构,它们包含有参与偶合质子信号的裂分形态的信息;③由于双量子滤波消除了所有不参

与偶合的共振信号,大大抑制了对角线上的溶剂峰和不参与偶合的质子峰,使接近对角峰、容易受到对角峰掩盖的相关峰显现出来,特别有利于复杂分子的结构解析。

此外,许多常规 2D-NMR 实验的完成和处理方式会把它们所包含的相位信息(峰是正还是负,是吸收型还是发散的)抛弃掉。虽然这对于某些实验实际上是更方便,而且也是无害的,但要是相位能被保留的话,COSY 能够产生许多额外的信息。配合相敏检测使交叉峰显示出具有精细结构的和包含有相位信息的图形,从这种图形可读出信号的裂分形态和偶合常数并进一步区分其中的裂分是起源于主动偶合还是被动偶合,是相邻偶合还是远程偶合。

最理想的相敏模式实验是相敏 DQF-COSY。在相敏 DQF-COSY 谱中交叉峰都是吸收型模式,并且带有正和负的相位信息。任何特定的核与核相关当然都是因为他们之间有偶合存在(称之为主动偶合)。但所包含的核可能还有与其他核的偶合(称之为被动偶合),所以交叉峰都以二维多重的形式出现。在这种多重峰中主动偶合产生的裂分峰幅度都显示出一种相位交替的基本模式,而被动偶合造成的裂分就没有相位改变。因此,主动偶合与被动偶合就很容易加以区分,只要看一看裂分是否有相位交替。这种信息的一个简单用途就是测定这种交叉峰是否起源于一个大数值的偶合,更一般地讲还能决定系统中所有的偶合常数,因此是一种非常有价值的工具。这一技术在复杂天然产物结构测定中已日益普及。可以预料,相敏 DQF-COSY 将会变成一种标准 COSY 技术,用于解决各种复杂的结构问题。作为一个例子,图 3－1 为后面将要讨论的多醚类抗生素 RVA18 的 DQF-COSY 谱。

相敏技术已在 2D-NMR 波谱中得到广泛采用,利用相敏技术不仅能够高分辨率的相关谱图,并且能够得到有用的相位信息。例如,检测质子间通过空间连接的 NOESY 谱也可以以相敏的形式进行,得到相敏的 NOESY 谱。图 3－2 就是 RVA18 的相敏 NOESY 谱。当然这一方法也有缺点,就是为了最好地利用相位信息往往采用较高的数字分辨率,因此实验需要的机时比较长。另外,因为它对核的弛豫不完全更为敏感,如果实验参数设定不当,容易产生假相关峰(人为造成的相关峰)。

(2) 2D-INADEQUATE(C,C-COSY)[13]

此外,还可以利用双量子滤波建立 C-C 直接相关的测试方法。由于 ^{13}C 的自然丰度为 1.1%,$^{13}C-^{13}C$ 对的发生概率只有万分之一,并且 ^{13}C 是低回磁比(ν)核种,因此 $^{13}C-^{13}C$ 相关信号极为微弱,并容易受到 $^{13}C-^{12}C$ 相干的干扰。可以利用双量子滤波压制 $^{13}C-^{12}C$ 相干信号的干扰,直接测定 $^{13}C-^{13}C$ 相关连接。这种方法称为 2D-INADEQUATE,它提供了直接探测分子中碳原子连接的测定方法,使得结构测定变得十分简单明了。但是这一方法灵敏度毕竟较低,只有在大量样品的情况

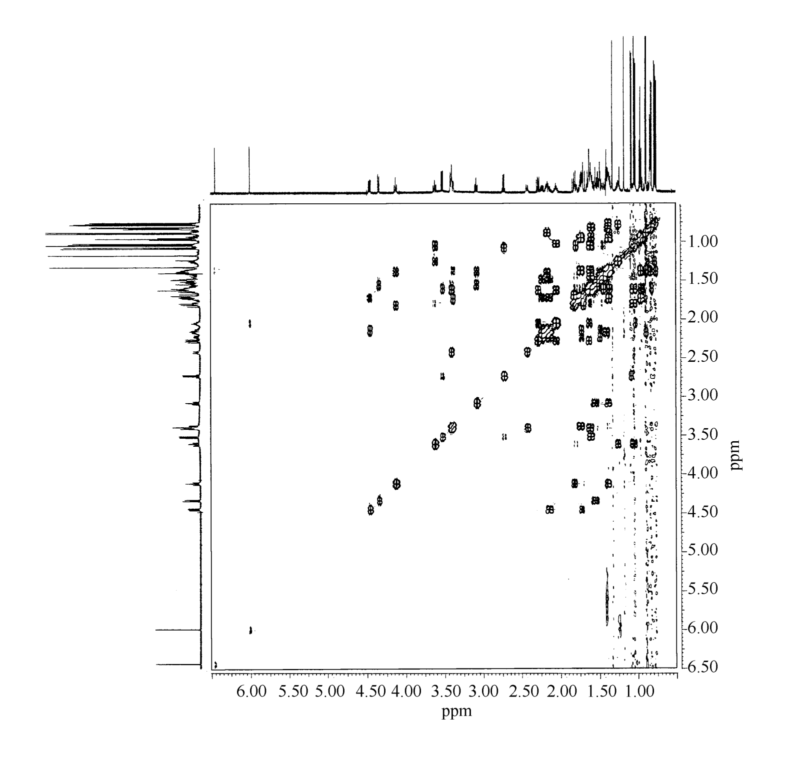


图 3－1 RVA18 的 DQF-COSY 谱

下使用,目前应用还不多。

2. 反检测核磁共振谱[14]

核磁共振波谱的灵敏度除了取决于所研究核种的天然丰度外,还与所研究核种的性质——回磁比(ν)有关(表 3－1)。以上讨论的异核相关谱都是通过激发质子的磁化,通过杂核检测质子磁化对杂核磁化的调制作用。因此,它们的检测灵敏度可以用因子 $\nu_H(\nu_X)^{3/2}$ 来估算。如果异核相关谱的激发和检测都可以通过质子磁化来进行,它的检测灵敏度因素就是$(\nu_H)^{5/2}$。由于^{1}H的回磁比是^{13}C的回磁比的 4 倍,换句话说,通过 H 检测的 C,H 相关谱的灵敏度是用 C 检测时的 8 倍,如果观测的杂核是回磁比(ν)值更小的^{15}N,则倍数更大(表 3－1)。这个灵敏度的提高使得检测异核间的直接和远程相关极为有利。因此,这种反检测的异核相关实验非常有吸引力。

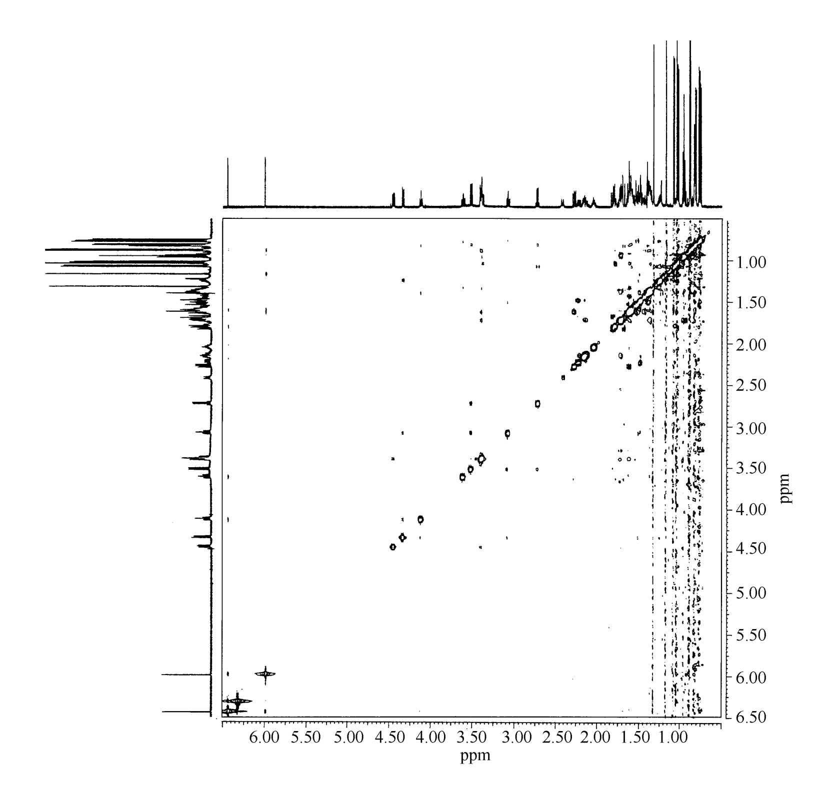


图 3-2　RVA18 的相敏 NOESY 谱

表 3-1　反检测核磁共振谱(inverse-NMR)灵敏度比较

实验	SN	放大倍数	C	N
Direct	$\nu_X(\nu_X)^{3/2}$		1.0	1.0
INEPT, DEPT	$\nu_H(\nu_X)^{3/2}$	$\nu_H(\nu_X)^{3/2}$	4.0	9.9
Inverse INEPT	$\nu_X(\nu_H)^{3/2}$	$\nu_H(\nu_X)^{3/2}$	7.9	31.0
Inverse Shift Correct	$\nu_H(\nu_X)^{3/2}$	$\nu_H(\nu_X)^{5/2}$	31.6	306.0

但是对于低天然丰度的杂核来讲,要进行反向检测,非 NMR 活性原子(如^{12}C)上的质子信号的抑制就成了严重问题。对于^{13}C核来讲,抑制比必须达 200∶1(对于^{15}N,达 600∶1),才能得到具有足够信噪比的谱图。这对于 NMR 谱仪就提出了严格的稳定性要求。如果不满足要求,就会产生很强的 t_1 噪声。借助于双量子滤波的选择作用可以有效抑制非 NMR 活性原子(如^{12}C)上的质子信号,使人们

可以以反转的形式来测定异核 COSY 波，即不是像通常的异核 COSY 是由^{13}C来检测，而是通过高回磁比(ν)的^{1}H核来检测。这样便大大提高了 NMR 方法的检测灵敏度。用这种方法来检测 C，H 之间的$^{1}J_{CH}$相关关系的叫做杂核多量子相干(HMQC)谱，用这种方法来检测 C，H 之间的$^{2}J_{CH}$和$^{3}J_{CH}$相关关系的叫做杂核多键相关谱(HMBC)。这两种反转(inverse)测定方法的建立把测定分子内$^{1}J_{CH}$、$^{2}J_{CH}$和$^{3}J_{CH}$相关信息的样品需要量降低了 1~2 个数量级。这对于一些样品来源极少的生物活性物质的研究极为有利。

(1) 异核多量子相干谱

异核多量子相干谱(heteronuclear multiple-quantum coherence, HMQC)[15]是一种通过 H 检测的^{1}H, ^{13}C-COSY 谱(区别于普通的 C, H-COSY)。它通常采用一种双线性的 BIRD 脉冲序列使所有不连接于^{13}C核的质子信号饱和，解决了多量子相干实验中的动态范围问题，使异核相关谱的灵敏度提高了几乎 1 个数量级。这一方法在复杂小分子的结构测定中已得到广泛应用。对于相对分子质量为 N 的样品，只要 $N\mu g$，在不到 10h 里就可得到有一定信噪比的^{1}H, ^{13}C-COSY 谱。图 3-3 给出 RVA18(M_W = 884)的 HMQC 谱，使用 12mg 样品，测试时间为 100min。

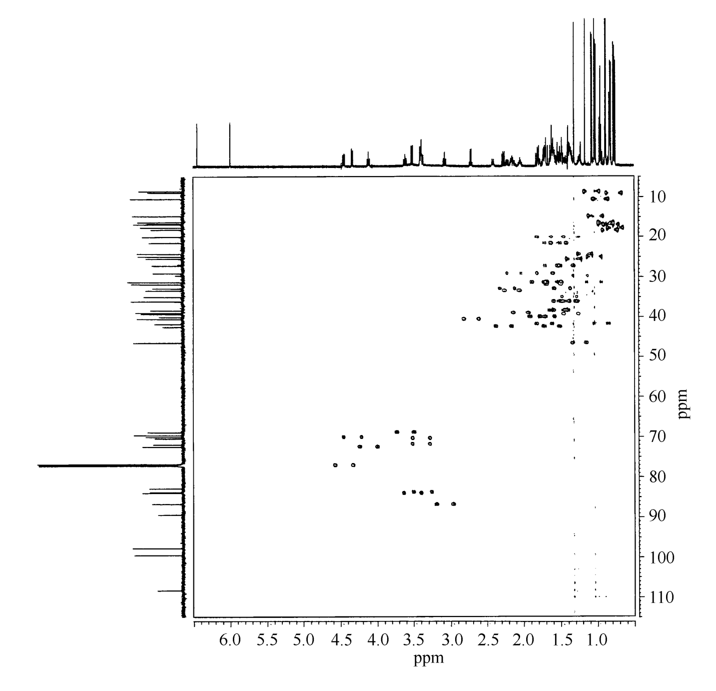


图 3-3 RVA18 的 HMQC 谱

(2) 异核多键连接谱

异核多键连接谱(heteronuclear multiple-bond connectivity, HMBC)[16]是一种通过H检测的远程C, H-COSY谱,它们能够通过H-NMR信号来检测相隔二键或三键的C—H远程偶合相关(即$^2J_{CH}$和$^3J_{CH}$)。图3－4就是RVA18的HMBC谱,只用了12mg样品,在600兆周的谱仪上测定了8h。图3－4中包含有100多个相关点,提供了大量的分子骨架的连接信息。需要说明的是,分子中甲基的质子信号特别适宜于用来检测C—H远程偶合,因为甲基信号特别强(包含了3个质子),并且对于甲基质子的$^2J_{CH}$和$^3J_{CH}$偶合常数很接近,都是4~5Hz,足以提供有效的磁化迁移。

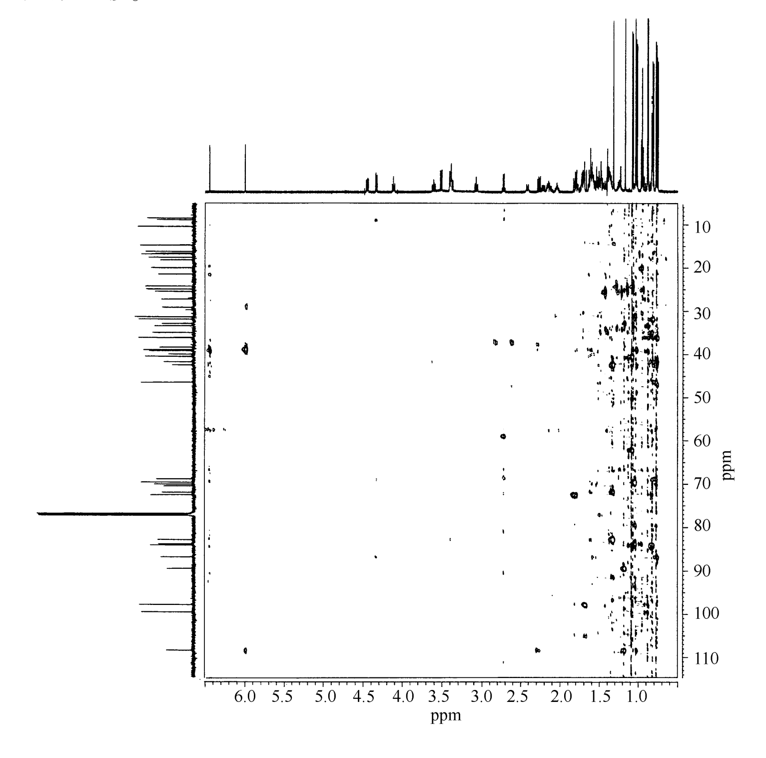


图3－4　RVA18的HMBC谱

多年来,HMBC实验已在复杂天然产物的结构分析中得到广泛的应用。特别是对于具有多个季碳原子或杂原子复杂分子的结构测定,能否得到足够的远程C, H偶合关系是结构解析能否取得成功的关键。这里实验参数的选择至关重要,必须选择测定的隔二键($^2J_{CH}$)和隔三键的($^3J_{CH}$)C, H偶合常数与分子中实际的偶

合常数尽可能一致。如果分子中待测 CH 远程偶合常数差别很大,有必要选择不同的偶合常数,进行多个 HMBC 实验,才能得到足够数量的远程偶合相关信息,供结构解析之需。为此,迫切需要有更高灵敏度,能够快速提供 C,H 远程偶合相关(即$^2J_{CH}$和$^3J_{CH}$)信息的实验。

近年来,随着脉冲梯度场技术的出现,已不必采用双量子滤波和复杂的相位循环的方法去消除非 NMR 活性原子(如^{12}C)上的质子信号,只要简单地通过脉冲梯度场的量子选择作用,就能够有效地抑制非 NMR 活性原子(如^{12}C)上的质子信号。这些借助于梯度场的反向检测实验分别称为 gHMQC 和 gHMBC。近年来安装的高场 NMR 谱仪或新型号谱仪都装备有梯度场探头,可完成梯度场实验。由于 gHMQC 和 gHMBC 实验灵敏度更高,实验用的时间更短,在结构鉴定中常常通过设定多个延迟时间不同的 HMBC 实验,以得到更多的远程 C,H 偶合关系。

3. 接力相干转移和多重接力相干转移测定方法的发展

核与核之间其磁矢量在磁场中进动时如果有相干作用存在,只要施加进一步的脉冲就能使这种相干沿偶合链重新分布。所谓"接力相干转移"就是说相干被转移到直接偶合的核之后,又被进一步转移到下一相邻核。在上述的 COSY 实验中通过追加一定的附加脉冲也可使这种磁化相干作用沿自旋偶合系统传播。这一概念导致了各种接力相干转移实验的产生。这种实验叫接力相关谱(relayed COSY)。根据参与相干接力的核种可以分为 H_1-H_2-H_3 接力(relayed COSY)和 H_1-H_2-C_2(relayed H,C-COSY)两种。前者的结果是质子 H 在 COSY 谱中不仅显示与 H_2 的相干点,而且进一步显示与 H_3 的相关峰,从而提供了分子中偶合链的接力相关信息。对于后者,H_1 不仅显示与 H_2 的邻位偶合,并且显示与 C_2 的$^2J_{CH}$偶合相关点,这种图谱叫做异核接力相关谱(relayed H,C-COSY),它实际上提供了 C_1-C_2 相关(相互连接)的信息。不仅如此,经过一次接力的相干转移还可通过脉冲序列做进一步的接力极化转移得到多重接力相干的图谱,从而提供 H_1-H_2-H_3…的偶合链信息。

(1) TOCSY 谱[17,18]

最近这种分子内 H 偶合链的接力相干信息,已可从交叉极化的现象来激发,只要使用一种称为 Hattmann Hahn 的脉冲序列就能激发磁化相干作用沿偶合链而传播,从而得到该质子与偶合链中其他质子的相干关系,这种谱称为 2D-HOHAHA谱。这种基于在自旋锁定(spin lock)条件下通过各向同性混合或交叉极化的原理而激发的磁化相干迁移能沿着偶合链而传播,传播的远近取决于脉冲序列中的自旋锁定时间的长短,如果自旋锁定时间足够长,能够提供从受激发信号起的整个偶合链的相关信息。因此,又称完全相关谱(total correlation spectroscopy,TOCSY)[17,18]。其主要优点是产生净磁化迁移,得到的是相敏的二维

谱,并且其中的相关峰都是吸收型的,谱图清晰、分辨率高。

各种接力相干转移实验、特别是 TOCSY 谱的出现解决了天然产物结构解析中的另外一个难题,这就是质子信号重叠的问题。因为质子信号的重叠会妨碍 H 自旋偶合链的解析。当一个由多个 H 信号组成的偶合链中有一个 H 信号与非此偶合链的其他 H 信号相互重叠时,由于无法判别下一个相关峰是与该 H 偶合,抑或是与其他 H 偶合,偶合链的解析便无法继续进行下去。采用 TOCSY 实验能够轻易地克服这个困难:只要从该偶合链中选择一个分辨良好、不与其他信号重叠的信号作为解析的起点(entrance point),便可以鉴定属于该偶合链的所有 H 信号。每一个 H 信号在偶合链中的序列归属可与 COSY 相互配合完成(详细的实例介绍见后文)。显然,这种方法对于解析具有多个偶合链、H 信号相互重叠严重的复杂分子非常有用。特别是对于由许多亚结构单元组成的天然化合物,如寡糖或配糖体、环肽或多肽和大环内酯等,为残基内或环内信号的归属提供了有力的工具。TOCSY 谱的运用是近代 2D-NMR 天然产物结构解析策略中的另外一个亮点。图 3-5 是 RVA18 的 TOCSY 谱。

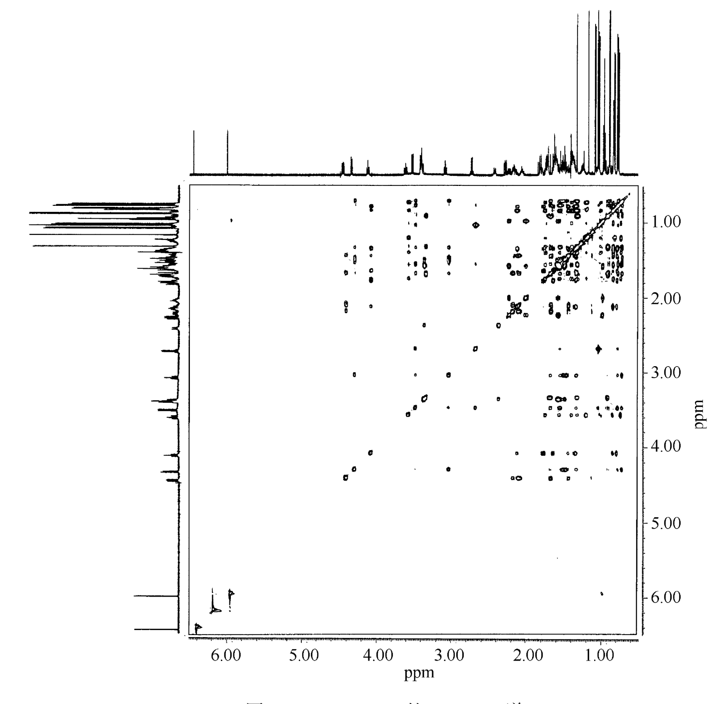


图 3-5　RVA18 的 TOCSY 谱

(2) ROESY 实验[19, 20]

前面说过,NOESY 谱在天然产物的结构测定中广泛用于提供通过空间的连接和立体化学的信息。它对于分子内 H 的磁偶极弛豫分布比较窄(分子内质子的弛豫性质十分相近)的小分子的研究特别有用,其最大 NOE 增强可达到相应对角峰的 20%。但是,随着研究的化合物更大、更复杂,其分子旋转相关时间 τ_C 越来越增加。另外,随着谱仪场强的提高,谱仪的角拉莫频率 ω_0 也越来越高。当 τ_C 与 ω_0 之积逐渐接近或达到 1($\omega_0\tau_C \approx 1$),NOE 的强度便接近于零。当 $\omega_0\tau_C$ 值大大超过 1 时,NOE 的强度达到相应对角峰的 50%。对于当前广泛用于复杂天然产物结构分析的 500 兆周和 600 兆周高分辨谱仪来说,其 τ_C 与 ω_0 之积逐渐接近或达到 1($\omega_0\tau_C \approx 1$)的相对分子质量范围在 800~ 2000 之间(取决于所研究的化合物)。这个范围正好是当前复杂天然产物(如环肽、植物配糖体、大环内酯等)出现最频繁的区域。利用 NOESY 谱测定 NOE 相关往往信号很少,对于结构解析十分不利。

近年来,这个问题已有了妥善的解决方法。这就是采用前面 TOCSY 实验中所采用的自旋锁定脉冲序列,在自旋锁定条件下,横向交叉弛豫分量防止了绕 z 轴的进动,所产生的旋转框架(rotating frame)NOE,其值总是正的,并且随 τ_C 的增加而增加,这样测定的 H,H 之间的 NOE 相关称为 ROESY 谱。因此,对于相对分子质量在 800~ 2000 之间的复杂天然产物可改用 ROESY,往往可以得到更多的 NOE 相关信号。当然这个方法也有局限性,就是在自旋锁定条件下,由于相干转移,容易产生假相关信号,应注意加以鉴别。ROESY 谱与 NOESY 谱一样,可以记录吸收模式的谱图,得到正的和负的相关信号,以利于区分假信号。此外,如果采用改良的脉冲序列,并且参数选择得当,ROESY 谱对这些分子的溶液构象分析十分有用。

采用上述基本的和改进的 2D-NMR 波谱介绍,对于普通的小分子化合物的结构解析已可提出一般的和系统的解析方法。这种分析方法所包含的主要策略是:①通过编辑的 DEPT 或 INDEPT 谱把 ^{13}C 共振信号分类为 CH、CH_2、CH_3 和季碳原子;②通过 ^{1}H,^{13}C-COSY 建立 C-H 组合单元;③通过 ^{1}H,^{1}H-COSY 谱解析分子的 H 自旋偶合骨架,并把它进一步转变为碳骨架部分构造。对于分子中的季碳原子和杂原子所造成的偶合链的中断可以通过 delayed COSY (LR-COSY) 实验提供的 $^{4}J_{H,H}$、$^{5}J_{H,H}$ 和 COLOC 实验所提供的 $^{2}J_{C,H}$ 和 $^{3}J_{C,H}$ 信息来连接,因为 $^{4}J_{H,H}$ 能提供 H—C—C*—C—H、H—C—X—C—H 的连接信息,而 $^{2}J_{C,H}$ 和 $^{3}J_{C,H}$ 反映了 H—C—C* 和 H—C—C*—C 或 H—C—X—C* (C* 为季碳原子,X 为杂原子)的相关信息。因此,根据这些信息,就可以“透过”分子中的杂原子和季碳原子,来建立分子的完整共价键骨架。如果通过键的连接还不足以构建分子的平面结构,可进一步采用 NOE 差谱或 NOESY(ROESY)谱提供的通过空间的连接。最后,可以采用 NOE 差谱或 NOESY(ROESY)谱来解决分子的相对构型或构象问题,得

到分子的三维结构。

笔者多年来采用 DQF-COSY、TOCSY、NOESY、ROESY、HMQC、HMBC 等二维核磁共振波谱，建立了一套从头开始的天然产物结构的系统解析方法，并用这个方法成功地测定了一系列皂苷化合物、寡糖、环肽、大环内酯、多醚类抗生素等复杂天然产物的结构。以下拟对这种系统结构解析法做一简要介绍。

三、新颖天然产物结构的系统测定法——从头开始的结构解析

前一节，我们介绍了近年来核磁共振波谱技术的发展和实验方法的进步以及如何利用 2D-NMR 波谱把分子中的各种核(包括 C，H，N 等)通过相互关联(correlation)进行连接的概念(包括通过键的连接，通过空间的连接和通过化学交换的连接)。由于核磁共振波谱已能对组成分子的每一个 NMR 活性核加以分辨，对其性质加以表征，利用核与核连接的概念就能把这些核连接起来，得到分子骨架。在有了分子骨架的基础上，再根据核磁共振提供的关于核与核空间相互关系的信息(如偶合常数和 NOE 相关等)解决分子的立体化学问题(包括分子的相对构型和构象)。综上所述，对于结构复杂的新颖天然产物分子的结构测定，今天较少采用以往的质子偶合形态分析来推断结构，而是从一开始就通过一维 H 谱和 C 谱，对组成分子的 C、H 核加以分辨，通过 DEPT 谱和 C、H 相关谱对 C、H 核的性质和连接关系进行分析，根据 C、H 核的化学位移对分子内可能存在的杂核如 N、O、P、S 和 X(卤素)原子及数量做出判断，再结合质谱或高分辨质谱的数据决定其分子式。然后，就大量采用 2D-NMR 波谱技术，对这些核之间的连接关系进行系统的解析，得到分子骨架。在此基础上，再进行详尽的质子偶合形态分析和空间关系分析，必要时进行各种谱学编辑和处理，解决分子的构型和构象问题，同时对分子的骨架结构进行验证。因此，与以往相比，今天的天然产物的 NMR 波谱分析的特点是：更多地运用杂核(如^{13}C、^{15}N)的 NMR 信息，更多地采用 2D-NMR 方法和 NMR 波谱编辑技术获得核与核相关和连接的信息，把分子片断连接成分子骨架。从大量的候补结构中寻找正确的结构这个以往结构测定中十分困难而缓慢的步骤，今天变得比较容易和快速。这正是得益于上述 NMR 波谱技术和实验方法的发展，也充分反映了近代天然产物结构测定中技术进步的精髓。以下以抗生素 alborixin 的结构测定为例，介绍天然产物结构系统测定法——从头开始的结构解析方法。

20 世纪 80 年代中期，中国科学院上海植物生理研究所郑幼霞等试图通过微生物原生质体融合重组的方法，发现新抗生素。他们通过庆丰链霉菌(streptomyces qingfengmycin)和井冈链霉菌(streptomyces jinggangmycin)的原生质体融合重组，得到一株编号为 RVA18 的新菌株，该菌株生产出一种抗生素 RVA18。RVA18 对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌显示较强的抑制作用。但是，其理化性质与庆丰链霉菌和井冈链霉菌生产的抗生素(分别为核苷类和氨基糖类抗生素)明显

不同。采用低场 NMR 波谱研究发现其结构极其复杂,研究工作延展数年,毫无结果。当时正值引进我国第一台 600 兆周高分辨 NMR 谱仪,便尝试采用 600 兆周谱仪进行分析,仅数周便一举确定结构。尽管最终结构鉴定为一已知的抗生素 alborixin,但是其结构测定是作者首次采用天然产物结构系统测定方法完成的,不失为是一个采用从头开始方法进行结构解析的好例子。

RVA18 为无色、无定形粉末,熔点 98~100℃;UV 显示末端吸收;IR 提示有羧酸、羟基和醚键存在(ν_{max} 为 3100~3500cm^{-1}, 2725cm^{-1}, 1030~1100 cm^{-1});$[\alpha]_D$ 为 −7.2°(丙酮);正离子 FAB 质谱显示准分子离子峰 m/z 为 907 [M + Na]$^+$ 和 923 [M + K]$^+$,提示相对分子质量为 884。负离子 FAB 质谱显示分子离子峰 m/z 为 884 [M]$^+$,进一步证实其相对分子质量为 884;^{1}H-NMR 谱见图 3-6,高场局部放大的谱图显示分子内有 12 个甲基存在,其中 3 个甲基(单峰)接在季 C 原子上,8 个甲基(双峰)接在叔 C 原子上,1 个甲基(三重峰)接在仲 C 原子上。低场局部放大的谱图显示有 8 个接氧原子的—CH—信号和 1 个 CH_3—CH—CO—信号,另外还有 3 个可交换质子存在;^{13}C NMR 和 DEPT 谱见图3-7,分类编辑的 DEPT 谱清楚地显示分子内有 48 个 C 原子,其中有 12 个甲基、12 个次甲基和 17 个亚甲基存在。凡未在 DEPT 谱中出现的^{13}C-NMR 信号可归属为季 C 信号,对照完全去偶的^{13}C-NMR 和 DEPT 谱,可发现有 7 个季 C 原子,其中 1 个出现在 δ176.4ppm,为羧基信号。进一步根据其化学位移可判断分子中有 16 个接氧 C 原子。结合质谱数据可以推断分子内有 14 个氧原子,其中 7 个为羟基,其余 7 个为醚氧原子,分子式初步推断为 $C_{48}H_{84}O_{14}$,分子不饱和度为 7。根据化学位移判断,分子内只有 1 个羰基存在于羧酸中,无其他双键和叁键存在。余下 6 个不饱和度提示有 6 个环,它们可能是由 6 个醚键构成的。因此可以推测 RVA18 可能为多醚类抗生素。

下一步采用 HMQC 实验建立分子内 C 原子与质子的连接关系,如前所述,HMQC 实验是一种反向检测(由质子检测)的 C、H 相关实验,具有灵敏度高、H 信号分辨率好的优点。图 3-8 是 RVA 18 的 HMQC 谱的低场放大图,需要说明的是图中每一个 C、H 相关点都裂分成两个峰,相应的 H 信号出现在两个峰的垂直平分线上。这是由于在实验中未对 C、H 之间的偶合进行去偶,导致 C、H 相关峰都裂分成两个峰。因此,这两个峰之间的距离(赫兹数)就是 C、H 偶合常数。图 3-8 中清楚地显示出有 9 个接氧的 CH 相关信号,由此立即可以归属其相关的 C 信号。此外,在化学位移 δ3.40ppm 处有相互重叠的 3 个 H 信号,在 HMQC 谱中清晰地显示与化学位移分别为 δ70.27ppm, 71.74ppm, 83.73ppm 的 3 个 C 信号相关。在高场的局部放大图中(图 3-9),12 个甲基质子信号根据清晰的相关信号很容易地归属于各自的 C 信号。2 个被巨大的甲基信号覆盖掩埋的质子信号 H_5 和 H_{12} 也很容易根据其相关信号而发现。C、H 相关实验的一个重要作用就是对 C 信号进行分类,

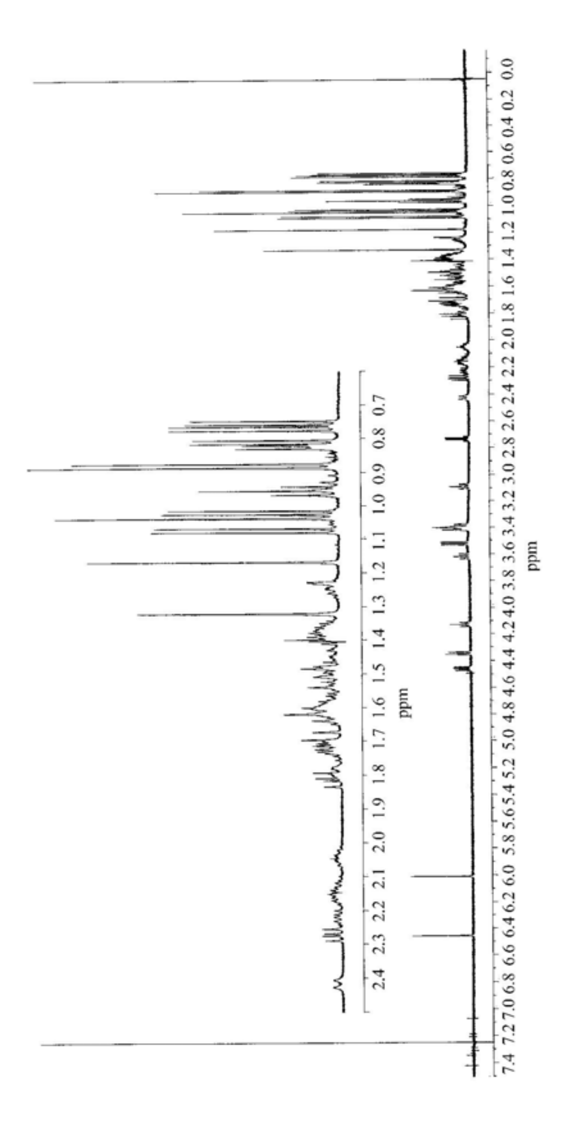
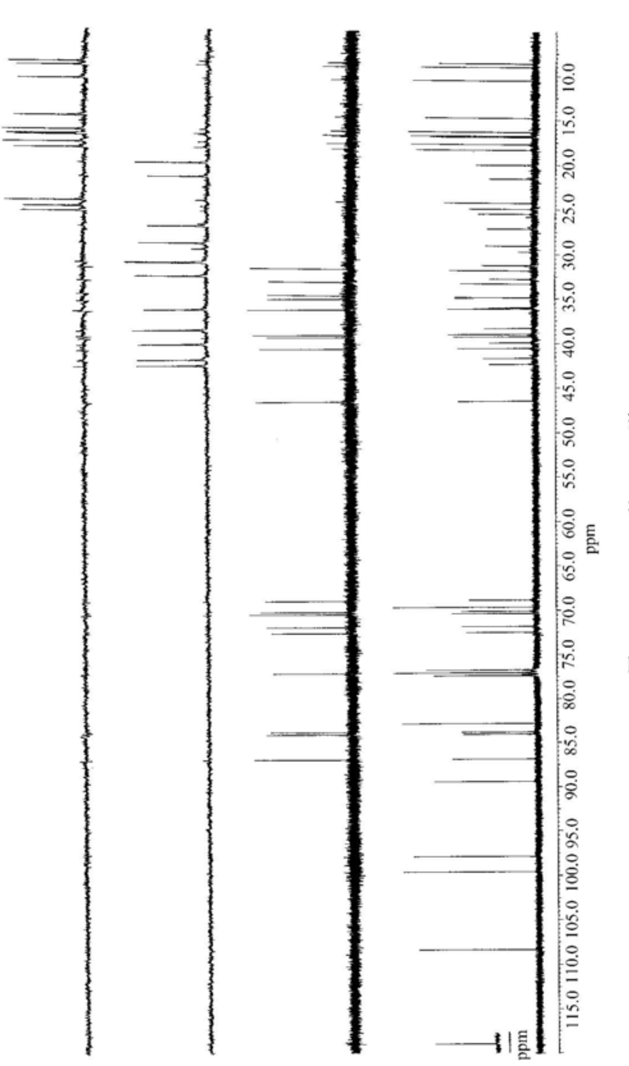

0.7 0.8 0.9 1.0 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 2.0 2.1 2.2 2.3 2.4
ppm
7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0
ppm

图 3－6　[illegible]18 的^1[illegible]谱



10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
60.0
65.0
70.0
75.0
80.0
85.0
90.0
95.0
100.0
105.0
110.0
115.0
ppm
ppm

图 3－7　[illegible]18 的 [illegible]谱

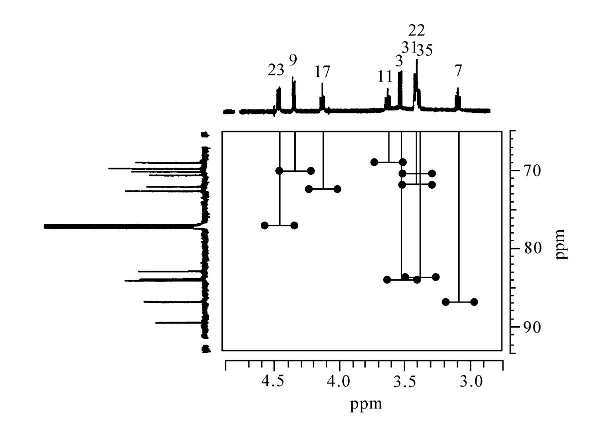


图 3－8　RVA18 的 HMQC 谱的低场放大图

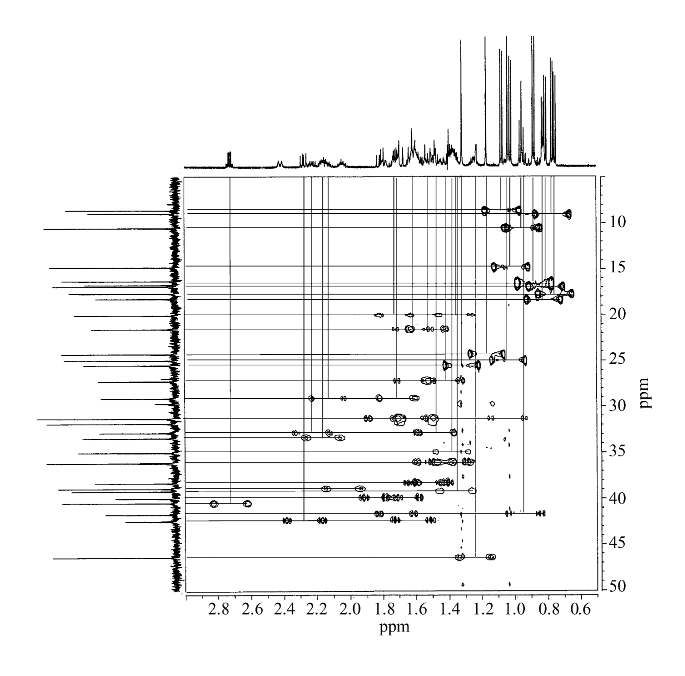


图 3－9　RVA18 的 HMQC 谱的高场放大图

可根据其连接 H 原子的数量确定其多重度。在高场侧 12 个与甲基的 3 个 H 原子相连 C 信号的多重度为 q,在低场侧 9 个与 1 个 H 原子连接的 C 信号的多重度为

d。这些结果与 DEPT 谱完全一致。在 H 谱的 δ1.20~2.80ppm 区域,特别是 δ1.30~1.90ppm 区域有大量质子信号相互重叠,分辨十分困难。但是,在 HMQC 谱中,这些区域的质子信号与其相应的 C 信号的相关信号沿 C 原子的化学位移而散布开来,根据相关峰的 X 轴(H 化学位移)和 Y 轴(C 化学位移)对应的 H、C 信号,便可把相应的信号关联起来,并做出归属。如果 X 轴(H 化学位移)的数据分辨率足够的高,可在各 C 信号对应的化学位移处对二维谱作截面,进行谱学编辑,得到各 C 信号对应质子的 H 亚谱,得到 H 信号的裂分形态,这对于严重重叠的 H 信号的分析十分有用。例如,在化学位移为 δ1.38ppm 和 δ1.60ppm 处有两个巨大的包络峰,由于信号重叠严重,无法加以分辨。从 HMQC 的高场局部放大图中可以知道,δ1.38ppm 的包络峰由 H_{14}、H_{16}、H_{18}、H_{19} 和 H_{36} 5 个 H 信号组成,δ1.60ppm 处的包络峰由 H_{33}、H_{4}、H_{29}、H_{33}、H_{32} 和 H_{13} 6 个质子信号组成。由此可见,C、H 相关实验的另一个重要作用就是可对 C、H 的连接关系进行归属,并且能够借助于其对信号的散布,拆分彼此重叠的质子信号。不仅如此,C、H 相关实验还能够提供有关质子间孪生的偶合关系。例如,对于 C_{36}、C_{32}、C_{13}、C_{24}、C_{12}、C_{33}、C_{25}、C_{19}、C_{8}、C_{16}、C_{5} 和 C_{29} 等信号分别显示有 2 个 H 信号与之相关,表明这些 C 信号的多重度是 t,因此与每一个 C 信号相连的 2 个 H 信号之间的偶合关系就是孪生的。对于结构复杂的天然产物,由于质子数量多,由于信号重叠,质子间偶合关系的解析(区分哪些是邻位偶合,哪些是孪生偶合)往往是十分复杂而困难的事。通过对多重度为 t 的 C 信号相关的 H 信号的解析就立即能够得到质子间孪生的偶合关系,这为下一步采用同核二维核磁共振波谱详尽地解析相邻质子间的偶合关系打下基础,大大简化其解析过程,这是 C、H 相关实验的又一个重要用途。在 HMQC 谱中未显示与任何 C 原子偶合相关的 H 信号就是与杂原子连接的 H 信号,一般都是可交换质子,可以通过用重水进行氘交换加以确认。在本例子中,化学位移分别为 δ5.997ppm 和 δ6.444ppm 的两个尖峰可归属为羟基质子信号。

在采用一维氢谱、碳谱和二维 C-H 相关谱(有时还配合使用 DEPT 谱)对组成分子的 C 信号和 H 信号及 C-H 直接连接关系进行充分解析之后,下一步的目标就要对 H 信号之间的偶合关系加以解析。任何两个质子间邻位偶合关系的发现与确认都可以看成是与这两个质子相连接的 C 原子之间共价键连接的直接证据,对于分子部分构造的建立具有重要的价值。对于构造简单的分子,利用 COSY 或 DQF-COSY 实验,通过逐级解析质子间的偶合关系就能直接完成分子中全部质子间自旋偶合链的解析,得到组成分子的部分构造。对于构造极其复杂的天然产物分子,分子内质子间偶合关系的解析就没有那么简单。

首先面临的问题是解析从何处着手进行。二维 NMR 波谱的解析应选择一个好的切入点(entry point)。好的切入点应该是一些分辨良好、容易识别的信号,它们可以明确地归属于特定的结构片断,又以某种方式与谱图中的其他信号连接。

从这个坚实的基础开始,我们就可以通过自旋偶合或 NOE 相关发现其相邻核,再通过进一步的相关发现下一个相邻核,如此重复,直到这一个系列中所有的相关用完为止,得到分子的一个部分构造。对于结构复杂的分子,常常需要寻找另一个切入点,进行新一轮归属,得到另一个部分构造。例如,图 3－10 中的信号 H_2 (δ 2.725ppm,dq),其化学位移提示为羰基的α-H,其自旋裂分为它进一步显示与 δ 1.072ppm(d)的甲基信号相偶合。这些偶合关系提示分子内一个—CH(CH_3)—COOH部分构造的存在,这个信号可以作为进一步解析的切入点。

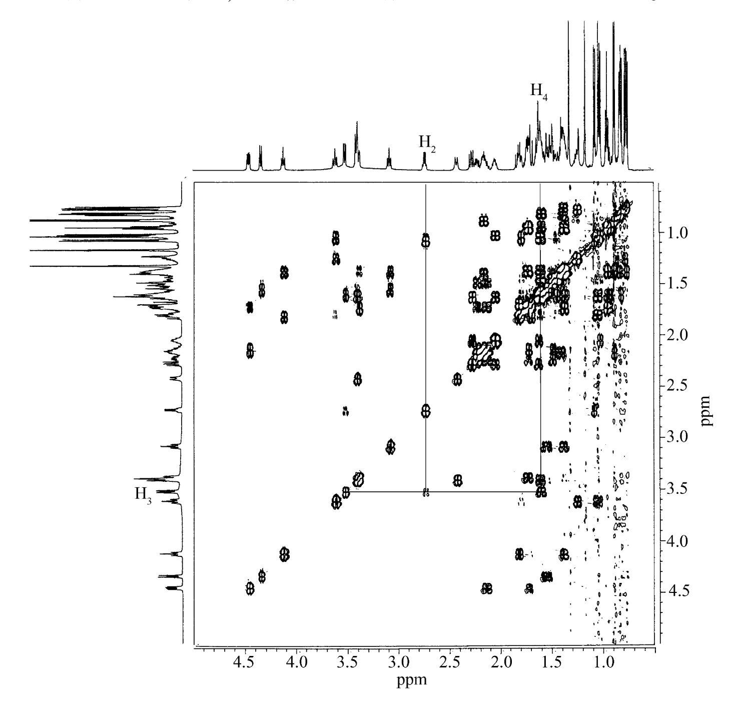


图 3－10　RVA18 的 DQF-COSY 谱高场放大图

复杂天然产物结构解析的最主要的困难之一是信号的重叠导致质子间自旋偶合链解析的中断,无法得到完整的分子部分构造。图 3－10 是 RVA18 的 DQF-COSY 谱高场放大图,谱图的低场侧信号分辨良好,质子间的偶合关系可以得到清晰的解析。谱图的高场侧,特别是靠近 δ1.3~ 1.8ppm 区域,信号重叠严重。任何质子自旋偶合链的解析一旦进入这个区域就无法继续,导致质子自旋偶合链解析的中断。换句话说,这里是多条质子自旋偶合链的交叉点,由于信号重叠无法确定下一个偶合相关点是属于哪一条自旋偶合链,多条质子自旋偶合链在这里形成

“死结”。例如,图 3－10 中显示 H_2 与 H_3,以及 H_3 与 H_4 的偶合相关峰。但是 H_4 的化学位移落入 δ1.6ppm 区域,如前所说该区域有 5 个 H 信号重叠在一起,尽管与该位置的其他偶合相关信号很多,但无法确定它们哪一个信号与 H_4 偶合相关,抑或是否与 H_4 偶合相关,自旋偶合链的解析无法继续。

现代核磁共振波谱技术为克服天然产物结构解析的这一难点提供了新的方法和途径,这就是前面提到的 TOCSY 实验,它与 DQF-COSY 实验相互配合,能够帮助人们透过这个盲点,完成整个自旋偶合链的解析。图 3－11 是 RVA18 的 TOCSY谱图的局部放大图,比较图 3－11 中从 H_2、H_3、H_7 和 H_9 等信号出发的偶合相关图式,可以发现它们相互之间都有类似或部分类似之处,表明它们是处于同一个质子自旋偶合链之中,这个质子自旋偶合链很长,包含的质子信号达十几个之多。这些质子间的自旋偶合关系既可以通过与 DQF-COSY 谱中相应位点的偶合相关信号进行比较,也可以通过与 TOCSY 谱中其他有关的接力偶合相关图式相互比较来完成。例如,在 DQF-COSY 谱中显示清晰的 H_2-(2-CH_3)-H_3-H_4 邻位偶合关系。由于 H_4 位于信号重叠严重的区域,在 DQF-COSY 谱中无法判断下一个自旋偶合质子,抑或自旋偶合链在 H_4 终止,自旋偶合链的解析无法继续。借助

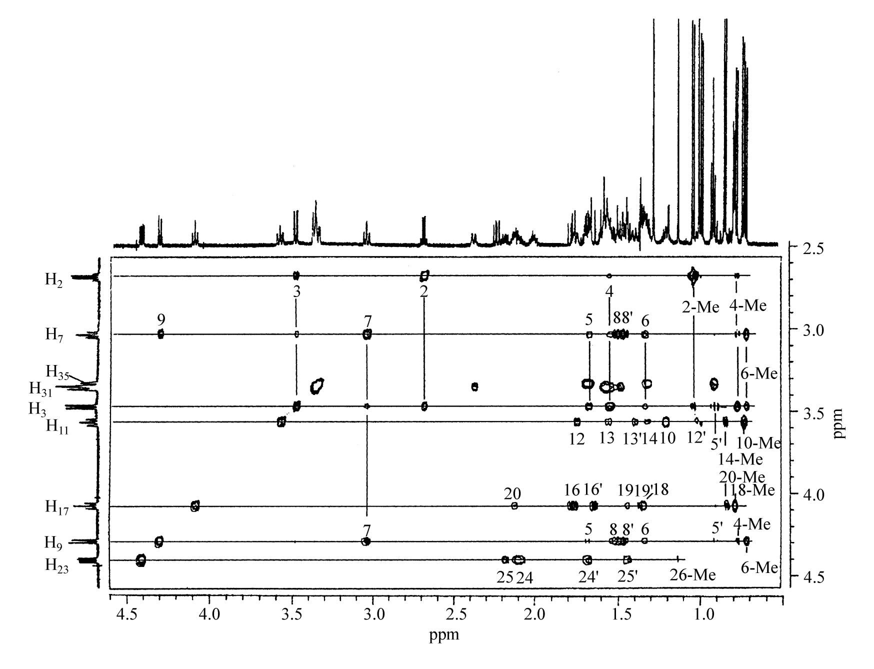


图 3－11 RVA18 的 TOCSY 谱图的局部放大图

于 TOCSY 实验,自旋偶合链的解析可以继续进行下去。TOCSY 谱中,H_2 除显示与 2-CH_3 和 H_3 之间的直接偶合外,还显示与 H_4 以及 4-CH_3 之间的接力偶合。其中 4-CH_3 信号的归属可以从 DQF-COSY 谱中 H_4 与 4-CH_3 间的相关峰得到进一步证实。这里需要指出,如果没有 TOCSY 谱中 H_2 与 4-CH_3 之间的接力相关,还无法根据 DQF-COSY 谱中 H_4 与该甲基的相关峰把该甲基信号归属为 4-CH_3,因为在 H_4 的位置上有多个 H 信号存在,无法肯定该甲基是与 H_4 还是与其他质子偶合。因此,DQF-COSY 谱中 H_4 与该甲基的相关峰只是进行归属的必要条件,还不是充分条件。与 DQF-COSY 相比,TOCSY 谱中 H_3 不仅显示与 H_2、H_4 的直接偶合相关,还显示与 H_5、$H_{5'}$、H_6、H_7、2-CH_3、4-CH_3、6-CH_3 等 H 信号之间的接力偶合相关。其中 2-CH_3、4-CH_3 信号归属是从上述分析得到的,至于 H_5、$H_{5'}$、H_6、H_7、6-CH_3 等信号归属是如何得到的,还需要 DQF-COSY 谱的配合。可从 DQF-COSY 谱中 H_4 的对角峰出发逐个核对 H_4 与上述质子之间(除 H_3 以外)是否有偶合相关峰出现。尽管在 δ1.3~1.8 ppm 区域许多交叉峰重叠严重,无法清晰地辨别。但是 H_4 与位于相对较高场的 $H_{5'}$ 之间的相关峰是清晰可辨的,因此 $H_{5'}$ 信号的归属可以确认。进一步根据 HMQC 实验提供的信息,从 $H_{5'}$ 可以归属 C_5 上的另一个 H 信号,它与 $H_{5'}$ 构成孪生偶合。从 H_5 信号出发在 DQF-COSY 谱又可以找到与 H_6 之间的偶合相关峰,从而归属 H_6 质子信号。从 H_6 信号出发,利用 DQF-COSY 谱很容易进一步归属 H_7 和 H_8 信号,可以把 TOCSY 谱中从 H_7 出发的偶合相关图式与从 H_3 出发的偶合相关图式进行比较,H_7 显示与 H_6、H_8、$H_{8'}$ 之间的直接偶合和与 H_5、H_4、H_3、H_9 以及 4-CH_3 之间的接力偶合,另一个与之接力偶合的较强甲基信号可归属为 6-CH_3,它可由 DQF-COSY 谱中 H_6 与 6-CH_3 之间的相关峰进一步证实。再把 TOCSY 谱中从 H_9 出发的自旋偶合图式与从 H_7 出发的自旋偶合图式进行比较,立即就可以从中识别其与 H_8 的直接偶合和与 H_7、H_6、H_5、H_4 以及与 4-CH_3、6-CH_3 之间的接力偶合。综合上述分析可以得到从 H_2 到 H_9 比较完整的自旋偶合链,其中 H_5、H_8 为次甲基质子信号,H_2、H_3、H_4、H_6、H_7 和 H_9 是亚甲基质子信号,C_2、C_4 和 C_6 上连接甲基,C_3、C_7 和 C_9 为接氧 C 原子。这些分析得到的结果与上述一维 H 谱和 C 谱以及 HMQC 实验得到的结果完全一致,体现出分析的严谨和结果的可靠性。

上述分析中,位于低场、分辨良好的 H_2、H_3、H_7 和 H_9 等质子信号可以看成是利用 DQF-COSY 和 TOCSY 谱进行自旋偶合链解析的起点或入口。除此之外,H_{11}、H_{17}、H_{22}、H_{23}、H_{31} 和 H_{35} 也是好的切入点,利用 DQF-COSY 和 TOCSY 谱分别进行类似的解析,可以得到如下 4 条质子自旋偶合链。进一步根据 HMQC 实验得到的 C-H 偶合关系,就能够得到 RVA18 分子的如图 3-12(a)所示的 6 个部分构造。

复杂天然产物结构解析的另一个难点就是分子内的季碳原子和 O、S 等杂原

(a)

(b)

(c)

图 3－12 通过 2D-NMR 波谱分析得到 RVA18 分子的部分构造

子。由于没有 H 原子的帮助,缺少连接信息,常常构成结构解析的盲点。RVA18 的分子结构除了上述部分构造以外,还有两个 OH 基团和一些季碳原子,部分构造之间被季碳原子和杂原子分割。结构解析的下一个步骤就是要透过这些季碳原子和杂原子,把这些部分构造拼接起来。近代核磁共振波谱技术为完成这个任务提供了有力的手段,这就是杂核多键连接(HMBC)实验。图 3－13 是 RVA18 的 HMBC 谱高场局部放大图,实验设定的 $^2J_{CH}$ 和 $^3J_{CH}$ 检测值为 6 Hz。它为把分子的部分构造拼接成为分子骨架提供了丰富而可靠的信息。高场局部放大谱图显示,除了 31-甲基以外,每一个甲基质子信号都与 3 个 C 原子发生 $^2J_{CH}$ 和 $^3J_{CH}$ 偶合。例如,2-CH_3 信号显示与 δ176. 4ppm(s), δ40. 4ppm(d) 和 δ83. 9ppm(d)三个 C 信号的多键相关,由于 C 信号 δ176. 4ppm 和 δ83. 9ppm 分别是季碳原子和接氧 C 原子,不可能与甲基连接。因此,δ40. 4ppm 可归属为 C_2,信号 δ176. 4ppm(s)和 δ83. 9ppm(d)可分别归属为 C_1 和 C_3(其中 C_1 信号由于其化学位移(δ176. 4ppm)超出谱图测定范围,图中显示的为折返信号)。另外,4-CH_3 信号显示与 δ83. 9ppm(d)、δ31. 8ppm(d)、δ41. 6ppm(t)三个 C 信号的多键相关,由于 δ83. 9ppm(d)已归属为 C_3,而 δ41. 6ppm(t)是次甲基 C 信号,不可能与甲基连接,甲基只能与化学位移为 δ31. 8ppm(d)的 C 原子连接,因此该信号可归属为 C_4,δ41. 6ppm(t)可归属为 C_5。6-CH_3 显示与 δ41. 6ppm、δ36. 1ppm 和 δ86. 8ppm 三个 C 信号多键相关,δ41. 6ppm 已归属为 C_5,δ86. 8ppm 为接氧次甲基信号,不可能与甲基连接,因此该甲基只可能与化学位移为 δ36. 1ppm 的 C 原子连接,因此 δ36. 1ppm 归属

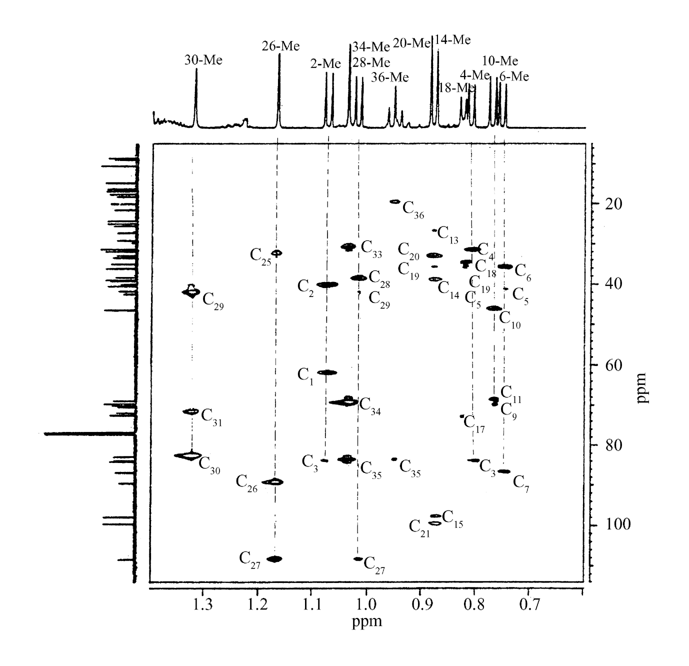


图 3－13　RVA18 的 HMBC 谱高场局部放大图

为 C_6，而 δ86.8ppm 归属为 C_7。这些通过 HMBC 实验进行的从 C_1 到 C_7 的归属与通过 TOCSY 实验得到的从 C_1 到 C_7 的归属是完全一致的，从而进一步增强了上述结构解析的可信度。下一个甲基信号 10-CH_3 显示与 δ70.0ppm，δ46.4ppm 和 δ68.8ppm 三个 C 信号远程偶合，由于 δ70.0ppm 和 δ68.8ppm 都是接氧 C 信号，所以该甲基只能与化学位移为 δ46.4ppm 的 C 原子连接，因此 δ46.4ppm 可归属为 C_{10}，δ70.0ppm 和 δ68.8ppm 可分别归属为 C_9 和 C_{11}。H_9 和 H_{10} 在 DQF-COSY 和 TOCSY 谱中未显示自旋偶合相关，可能是由于两质子间的二面角接近于 90°，偶合常数接近于零，因此用 COSY 实验无法检测得到。借助于 HMBC 实验提供的信息，分子片断 1 和分子片断 2 得以拼接成为有关更大的分子片断。下一个甲基信号是 14-CH_3，它显示与 δ27.2ppm(t)，δ39.1ppm(d) 和 δ97.8ppm(s) 三个 C 信号的远程相关。由于 δ27.2ppm 为次甲基信号，δ97.8ppm 为季碳原子信号，它们都不可能与甲基连接，甲基只能与化学位移为 δ39.1ppm 的 C 原子连接，因此该 C 原子可归属为 C_{14}，而 δ27.2ppm 和 δ97.8ppm 可分别归属为 C_{13} 和 C_{15}，借此季碳原子 C_{15} 被接入到左侧的分子片断中。把季碳原子 C_{15} 被接入到右侧的分子片断中是通过 H_{16} 和 $H_{16'}$ 两个孪生质子完成的，它们在 HMBC 谱中，分别显示与 C_{15} 和 C_{17}（δ72.4ppm）的远程相关。这样不仅把 C_{15} 接入到右侧的

分子片断之中，而且把前面的 3 个分子片断连接成为一个从 C_1 到 C_{20} 的更大片断。类似地利用 20-CH_3 提供的 $^2J_{CH}$ 和 $^3J_{CH}$ 相关，可把接氧季碳原子 C_{21} 接入这个大分子片断。分子在 C_{26} 和 C_{27} 出现两个连续的季碳原子，它们所分割的分子片断同样能够通过甲基提供的 $^2J_{CH}$ 和 $^3J_{CH}$ 远程相关信息而拼接起来。26-CH_3 显示与 δ32.8ppm(t)，δ89.3ppm(s)和 δ108.3ppm(s)三个 C 信号的远程相关，26-CH_3 是单峰，显然不会与化学位移为 δ32.8ppm 次甲基连接，而 δ108.3ppm 是属于半缩醛季碳原子，也无法连接甲基，因此 δ89.3ppm 可归属为 C_{26}，而 δ32.8ppm 和 δ108.3ppm 的信号可分别归属为 C_{25} 和 C_{27}。紧接着，28-CH_3 显示与 δ108.3ppm(s)，δ38.8ppm(d)和 δ42.3ppm(t) 三个 C 信号的远程相关。显然，该甲基只可能与化学位移为 δ38.8ppm 的亚甲基连接，因此，δ38.8ppm 可归属为 C_{28}，δ108.3ppm 已归属为 C_{27}，余下的信号 δ42.3ppm 可归属为 C_{29}。同样，利用 30-CH_3 提供的远程相关可透过季碳原子 C_{30} 把两侧的分子片断连接起来，生成一个从 C_{22}～C_{37} 的分子大片断。通过 CH 远程相关分析得到的 RVA18 的部分构造如图 3-12(b)所示。把通过 TOCSY 谱和 HMBC 谱分析得到的部分构造综合起来可以得到图 3-12(c)的分子构造。由于 H_{22} 未能显示与 C_{21} 的远程相关，分子左右两个大片断暂时还无法拼接起来形成统一的分子骨架。

以上主要是利用核磁共振波谱提供的通过键的连接信息，进行分子片断的拼接。至此，尽管用尽了所有通过键的连接信息，仍然无法得到完整的分子骨架。前面提到，核磁共振能够提供的连接分子部分构造的手段，除了通过键的连接之外，还有所谓通过空间的连接。这就是利用 NOE 相关信号提供的质子间空间相互接近的信息。质子间 NOE 相关的信息可以通过 NOE 差谱或二维 NOESY 谱得到。对于复杂的天然产物，质子与质子空间相互接近的信息十分复杂，故大多采用二维 NOESY 实验，检测分子内存在的所有 NOE 相关信息。图 3-14、图 3-15 分别是 RVA18 的 NOESY 谱局部放大图和低场局部放大图，它包含有大量分子内质子间空间相互接近的信息。首先，δ5.997ppm 的 OH 信号与 26-CH_3 显示 NOE 相关，提示该信号可归属为 27-OH。δ6.444ppm 的 OH 信号与 14-CH_3 有 NOE 相关，表明该信号可归属为 15-OH。这两个 OH 信号的化学位移值和它们尖锐的峰形表明它们可能连接在半缩醛 C 原子上。另外，H_3 和 H_7 显示 NOE 相关，它们又都是接氧 C 原子上的质子，上述 NOE 相关信息提示它们所接的两个接氧 C 原子通过醚键连接，形成六元环。H_{11} 和 15-OH 显示 NOE 相关，表明 C_{11} 和半缩醛季碳原子 C_{15} 通过醚键生成另一个六元环。27-OH 信号与 30-CH_3 信号显示 NOE 相关，提示 C_{27} 与 C_{30} 通过醚键形成五元环。其中 C_{27} 半缩醛 C 信号的化学位移为 δ108.3ppm。与之相比，分子内另一个半缩醛 C 原子 C_{21} 的化学位移为 δ99.1ppm，提示该 C 原子可能包含在一个六元环中。根据其所处的周围环境，可判断它与 C_{17} 通过醚键形成六元环。另外，H_{31} 显示与 H_{36} 的 NOE 相关，表明 C_{31} 与接氧 C 原

子 C_{35} 通过醚键生成另一个六元环。至此,除 C_{21} 和 C_{22} 还各留下一个连接点外,分子内所有 C 原子的价键都已连接完毕。由于 20-CH_3 显示与 H_{22} 的 NOE 相关,提示 20-CH_3 与 H_{22} 在空间相互接近,提示 C_{22} 和季碳原子 C_{21} 相连。据此,可以把分子左右两个大片断连接在一起得到整个分子的骨架。从以上分析可以看到,在把部分构造连接成为分子骨架方面,质子间的 NOE 相关所提供的“通过空间的连接”信息是对“通过键的连接”的有力补充,对于连接被杂原子分割的原子团或部分构造能够提供十分有价值的信息。

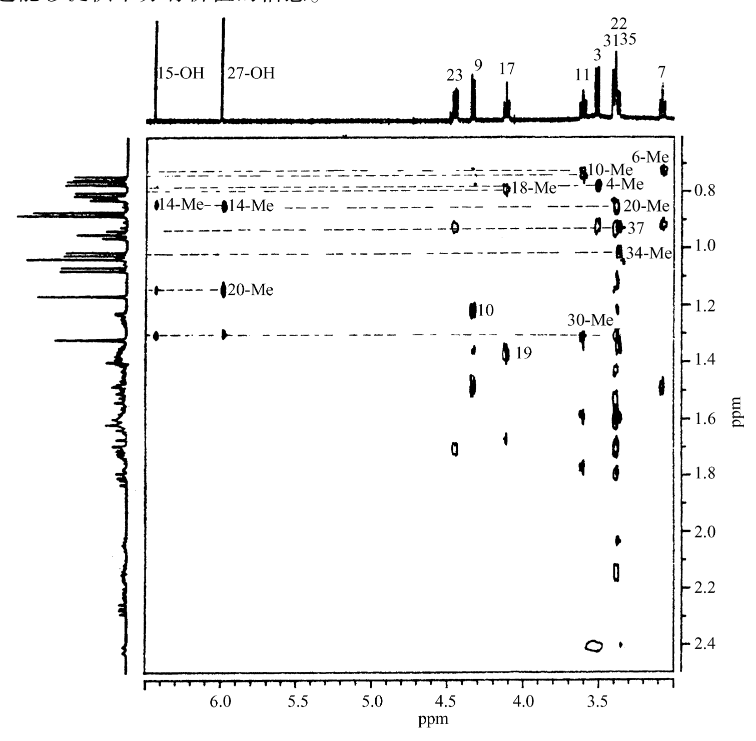


图 3-14 RVA18 的 NOESY 谱局部放大图

在得到分子骨架之后,结构解析的下一个目标就是解析分子的相对立体化学和构象问题。上述能够提供“通过空间的连接”的质子间 NOE 相关信息对于解决分子的相对立体化学和构象问题同样能够提供大量有用的信息。例如,在环 A 中,H_3 与 H_7 之间有 NOE,表明它们是顺式取代。H_3 与 4-CH_3 之间和 H_7 与 6-CH_3 之间的 NOE 相关提示 H_3、H_7、4-CH_3 和 6-CH_3 都是顺式取代。同样在环 B 中,14-CH_3 与 15-OH 之间的 NOE 相关提示它们是顺式取代。图 3-16 列出了

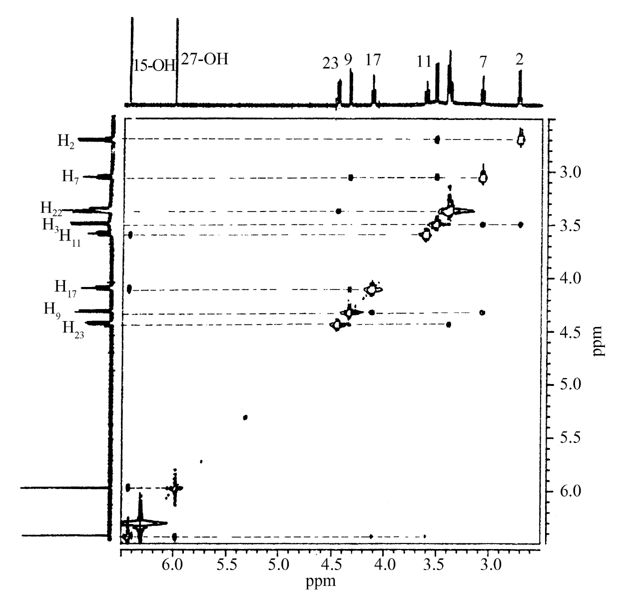


图 3-15　RVA18 的 NOESY 谱低场局部放大图

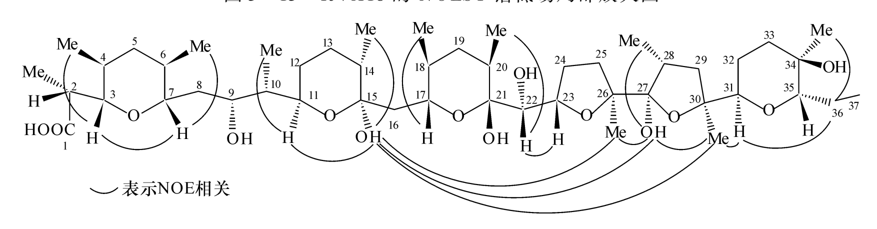


图 3-16　RVA18 的分子内 NOE 相关和相对立体化学

NOESY 谱中所有观测到的分子内 NOE 相关信息,根据这些信息,可以对分子的相对立体化学做出明确的归属。不仅如此,十分有趣的是,NOESY 谱中还包含有一些分子内远程的 NOE 相关信息,就是说在分子平面构造中一些远隔质子间有 NOE 相关。例如,H_{11} 和 15-OH 与远隔的 30-CH_3 之间显示 NOE 相关,14-CH_3 和 15-OH 与 27-OH 之间也显示 NOE 相关。这些远隔质子间的 NOE 相关只能用分子骨架的折叠来解释,它表明分子的构象并非如平面结构所示那样是伸展的,分子的主链可能在某个位点发生了转折。根据 NOE 相关信息判断,转折位点可能发生在 C_{22}。这个假设被进一步的分子溶液构象的计算机模拟的结果所证实,将上述观测到的分子内 NOE 相关信息作为约束,对分子的三维溶液构象进行动力学模拟,然后进行能量优化。得到的结果表明分子确实在空间发生了折叠,转折点在

C_{22}。不仅如此，折叠了的分子还进一步折叠，呈抱球状，犹如网球。分子的主链在空间的走向犹如网球的缝合线，主链上的羟基和氧原子大多向内指向球心，由 C、H 链构成的表面呈疏水性。

上述就是从头开始的 RVA18 多醚类抗生素结构解析的全过程，这个过程可以大致归纳为以下几个步骤：

1) 通过 ^{1}H-NMR 谱、^{13}C-NMR谱、DEPT 谱分析，结合质谱、红外、紫外与可见光谱等的信息，确定化合物的相对分子质量、分子式和化合物类型；

2) 采用 DQF-COSY、TOCSY 等实验对分子内质子的自旋偶合链进行详尽的分析，完成对 ^{1}H-NMR信号的归属；

3) 通过 HMQC 实验获得分子的 $^{1}J_{CH}$ 相关信息，利用步骤 2)得到的信息对接氢 C 信号进行归属，并将分子内质子的自旋偶合链转变成为分子部分构造的 C 骨架；

4) 采用 HMBC 实验检测分子内的 $^{2}J_{CH}$ 和 $^{3}J_{CH}$ 相关信息，利用 $^{2}J_{CH}$ 和 $^{3}J_{CH}$ 相关信息进行跨越非接氢 C 原子和杂原子的连接，完成季碳原子的信号归属；

5) 通过 NOESY(或 ROESY)实验检测质子间的 NOE 相关，利用 NOE 提供的通过空间的连接信息，补充和完善分子的平面构造解析，在此基础上进一步讨论分子的相对构型和溶液构象等立体化学问题。

采用系统测定法鉴定天然产物的结构的一个重要优点是能够实现 C、H 相互全归属，因此得到的最终结构比较可信。此外，结构解析过程中得到的 $^{3}J_{HH}$ 和 $^{3}J_{CH}$ 偶合常数以及质子间 NOE 相关信息都可以作为约束，用于分子溶液构象研究。有关分子溶液构象的知识是讨论生物活性分子的作用机制和构效关系的重要基础，在生物医药高技术的发展中是至关重要的。

四、结语

近代 NMR 波谱技术对于处理结构问题的巨大潜力已促使这些技术在天然产物化学中的广泛应用，用来解决未知化合物的结构问题、波谱数据的归属问题和复杂的立体化学问题。由于 NMR 测试方法种类繁多，对于每一个具体的结构问题常常有多种测试方法供选择，因此必须根据样品的多少、结构的复杂性、样品的弛豫性质、实验的难易程度、所需的分辨率和所用仪器的性能等因素来考虑具体采用何种实验方法。从多种多样的实验方法中中选择最简便、最富有信息、最可靠的测试方法。

第二节　质　　谱[21~23]

质谱(mass spectroscopy，MS)是记录分析样品在质谱仪中经高温(300℃)气化，在离子源受一定能量冲击产生阳离子，而后在稳定磁场中按质量和电荷之比

(m/z)顺序进行分离并通过检测器表达的图谱。图中的每一个峰代表一个质量数。根据分子离子峰(通常在最高处)与碎片峰的质荷比推导化合物的结构。高分辨质谱则直接给出相对分子质量的精确数字和分子式。这是解析化合物结构的重要基础。但质谱中不能用平均相对原子质量(如氯为 35.45)计算,而要用^{35}Cl为 34.968 853 59。一般以^{12}C为12.000 000 00为标准。有机化合物中各元素与其同位素的精确质量如下:

^{1}H = 1.007 825 22	^{29}Si = 28.976 496 9
^{2}H = 2.014 102 22	^{30}Si = 29.973 772 2
^{12}C = 12.000 000 00	^{31}P = 30.973 763 3
^{13}C = 13.003 355 08	^{32}S = 31.972 072 8
^{14}N = 14.003 074 40	^{33}S = 32.971 459 1
^{15}N = 15.000 109 3	^{34}S = 33.967 870 1
^{16}O = 15.994 915 02	^{35}Cl = 34.968 853 59
^{17}O = 16.999 133 3	^{37}Cl = 36.965 903 04
^{18}O = 17.999 159 96	^{79}Br = 78.918 332 0
^{19}F = 18.998 404 6	^{81}Br = 80.916 292
^{28}Si = 27.976 928 6	^{127}I = 126.904 475 5

质谱常用的离子源是电子轰击源,即利用低能量(70eV)的慢电子轰击样品的气体分子使成阳离子,称为电子轰击质谱(electron impact mass spectra, EI-MS)。近年来质谱技术已有很大发展。

新技术电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)与基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)已日益普及,而联有飞行时间(time of flight, TOF)的 MALDI-TOF-MS 与 ESI-TOF-MS 仪还可一次分析几千个生物大分子,从而大大促进了高效筛选(high-throughput screening)药物的进程。质谱仪发展的另一热点是与液相色谱相联,目前较普及的有 LC-MS、LC-MS-MS、LC-ESI 等。

第三节 红外光谱[24]

红外光谱(IR)是记录有机分子吸收红外光后产生化学键振动而形成的吸收光谱。测定范围一般是 ν_{max} 为 500~ 4000cm^{-1},其中 500~ 1500cm^{-1} 为 C—C、C—O、C—N 等单键区,1500~ 1800cm^{-1} 为 C ═ C、C ═ O、C ═ N 等双键区,2200cm^{-1} 附近为 C≡C、C≡N 叁键区,3500cm^{-1} 附近为 O—H、N—H 氢键区。最方便的方法是将样品与 KBr 混合压片,它能处理少至 5~ 10μg 的样品,由于在压

片过程中不可避免地要吸收水分,因而在 3400cm^{-1} 和 1640cm^{-1} 附近常出现吸收峰,如将 KBr 片在 1mmHg① 压力下于 40~ 50℃加热数小时可避免此现象,或样品与石蜡糊(nujol mull)研磨,它不吸收水分,但在 720cm^{-1}、1378cm^{-1}、1458cm^{-1}、2861cm^{-1}、2919cm^{-1} 处会出现石蜡的弱吸收峰。也可将样品溶解在非极性溶剂($CHCl_3$、CCl_4 等)中测试,但所有溶剂本身都有很强的吸收峰,其强度取决于溶液池的厚度,如果溶剂吸收强度大于 80%就无法进行精确的记录。如果样品为液体也可制成液膜直接测试。

由于核磁共振谱与质谱的普及,红外光谱的应用范围相对缩小。它主要用于鉴别各种羰基(1500~ 1800cm^{-1})、炔烃与腈基(2200~ 2300cm^{-1})、羟基与胺基(3500~ 3600cm^{-1})等基团。此外,也用于核对化合物,当两个化合物的红外光谱所有吸收峰,特别是灵敏的指纹区(500~ 1500cm^{-1})的吸收峰完全吻合,则可确定两个化合物的结构完全一致。

第四节　紫外光谱[24]

紫外光谱(UV)记录有机分子在吸收紫外光(λ_{max})200~ 400nm 后产生电子振动而形成的吸收光谱,常用以测定分子内的共轭系统。二维核磁共振谱的发展已使 UV 成为次要手段。

一、Beer 定律

Beer 定律为

$$d(\text{或 } A) = \lg I_0 / I = \varepsilon c l$$

式中:d——光密度;

A——消光度;

I_0, I——入射光强度和透过光强度;

ε——1000cm^2/mol 时的摩尔消光系数;

c——浓度;

l——池的厚度。

当相对分子质量未知时,可用 $E_{1\%}^{1cm}$ 表示,它们之间的关系是

$$E_{1\%}^{1cm} \times \text{相对分子质量} = \varepsilon \times 10$$

能量 E 和光的波长 λ 之间的关系如下

$$E(\text{kcal}^{②}/\text{mol}) = 28.6 \times 1000/\lambda(\text{nm})$$

① mmHg 为非法定单位,1mmHg = 1.333 22× 10^2 Pa,下同。

② cal 为非法定单位,1cal = 4.1868J,下同。

ε值可近似地用下式表示

$$\varepsilon = 0.87 \times 10^{20} Pa$$

式中：P——迁移概率(0～1)；

a——发色团的横截面积，在多数情况下约为 10Å^2。

如果 $P = 1$，ε最大值约为 10^5，实测值 ε最大值为 10^6 数量级。

二、溶剂

常用甲醇或乙醇作溶剂，一种溶剂的截波长(cut off wavelength)是由波长和它最长波长的最大吸收值强度决定的。10mm 池(如用 1mm 池，则下列数值应增长 5nm)中某些溶剂的截波长(nm)如表 3－2 所示。

表 3－2　某些溶剂的截波长

溶剂	截波长/nm	溶剂	截波长/nm
H_2O, MeCN	190	Et_2O，二氧六环	215
环己烷	195	CH_2Cl_2	220
n-C_6H_{14}，MeOH	200	$CHCl_3$	240
EtOH，$(MeO)_3PO$	200	CCl_4	260

当溶剂极性增加时，极性键的跃迁(如羰基，但不是乙烯类)受溶剂极性的影响其变化如下：①$\pi \to \pi^*$ 带发生向红位移(激发态比基态极性更大，因而在极性溶剂中比基态更稳定)；②$n \to \pi^*$ 带发生向蓝位移(带有 2 个 n 电子的基态比仅带有一个 n 电子的激发态更稳定)。

例如，对于 4-甲基-3-戊烯-2-酮(mesityl oxide)，观察到两带向反方向位移(表 3－3)。

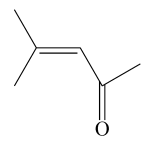


表 3－3　溶剂对于吸收带的影响

溶剂	λ/nm(ε)		Δλ/mm
	$\pi \to \pi^*$	$n \to \pi^*$	
正己烷	230(12 600)	327(98)	97
乙醚	230(12 600)	326(96)	96
乙醇	237(12 600)	315(78)	78
水	245(10 000)	305(60)	60

酮的 $n \to \pi^*$ 吸收带：酮的吸收带(饱和酮及 α，β-不饱和酮)ε 10～100，波长

270~ 330nm,是弱吸收带中最重要的一个。这样的吸收带的测定需要浓溶液,同时由于附近有大的 ε 值吸收带的存在,也使测定困难。然而,从诊断的目的来看,它的测定还是很重要的。由于天然产物中的酮基常常与强的 $n \to \pi^*$ Cotton 效应有关,因此通常测定 CD 或 ORD 来代替 UV,在 $n \to \pi^*$ 区域内检测酮就更简便。

第五节　圆二色谱[25~30]

圆二色谱(circular dichroism,CD)可记录化合物在紫外光与可见光区所产生的椭圆偏振光的椭圆度与波长的关系。圆二色谱是透过介质后光的吸收曲线,而旋光谱则是它的分散曲线。

比椭圆度为

$$[\psi] = \psi / lc$$

式中:ψ——椭圆角;

l——池长,dm;

c——浓度,g/mL。

分子椭圆度

$$[\theta] = ([\psi] \times \text{相对分子质量})/100 = 3300\Delta\varepsilon$$

微分圆二吸收为

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

式中:ε_L——左极化光的 ε;

ε_R——右极化光的 ε。

下列关系适用于饱和酮的 $n \to \pi^*$ 带:

$$a = 40.28\Delta\varepsilon$$

或

$$a = 0.0122[\theta]$$

上述关系可用于除酮类外的 CD 及 ORD 数据的近似互换。

一、绝对构型的推定

由于一个已知其相对构型的化合物的绝对构型仅有两种可能性,CD 的测定将有助于推定出正确的结果。

D 线旋转不能用于构型的分析。即使对酮的八区律(它是最先引入 ORD 和 CD 的规则之一,并对这一领域的发展起了很大的推动作用),用起来也要很小心。

二、酮的八区律

酮的八区律(octant rule for ketone)最初是为估价取代基对环己酮 $n \to \pi^*$ 柯

登效应符号的贡献而发展起来的。环被羰基 n→π* 节面 A 和对称面 B 分成一个象限体(quadrant),B 面垂直于 A 面且切于 C-1 和 C-4[图 3-17(a)、(b)]。原先,这象限体还要进一步被第三个垂直于 A 和 B 且通过 C═O 碳的平面等分(因而称八区律),然而第三个面已不再用了。

酮的象限规则:在右下和左上象限的原子或基团对柯登效应贡献为正;相反,在另两个象限的则为负[图 3-17(c)]。直立键(a 键)取代基的贡献按下列顺序减少:

$$I > Br > Cl > NH_2 > OH > Me > OAc > H$$

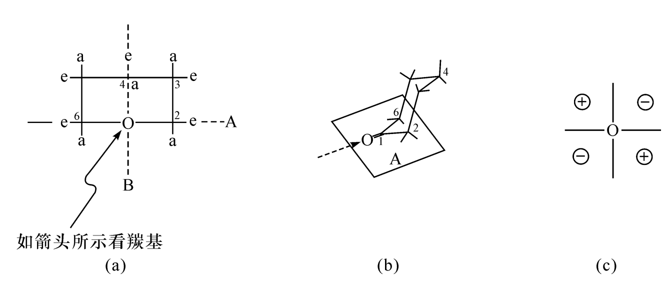


图 3-17　酮的八区图

参　考　书　目

[1] Barton D H R et al. Comprehension of Natural Product Chemistry. New York:Elve Science, 1989

[2] Nakanishi K et al. Natural Product Chemistry. New York:Academic Press, 1983

[3] 林启寿. 中草药成分化学. 北京:科学出版社, 1977

[4] 姚新生. 天然药物化学 (第二版). 北京:人民卫生出版社, 1988

[5] 徐任生, 陈仲良. 中草药分子成分提取与分离 (第二版). 上海:上海科技出版社, 1983

参　考　文　献

[1] Breitmaier E. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry. New York: John Wiley & Sons, 1993

[2] Pretsch E, Thomas P D. Tabllen zur Strukturaufklarung Organischer Verbindungen mit Spektroskopischen Methoden. Berlin: Springer-Verlag,1981

[3] Breitmaier E, Voelter W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. New York: VCH, 1990

[4] Atta-ur-Rahman. One and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. New York: Elseviar,1989

[5] Sanders J K M, Hunter B K. Modern NMR Spectroscopy. Oxford: Oxford University Press,1993

[6] Kessler H, Gehrke M, Griesinger C. Inter. Ed., 1988, 27(4): 447~ 592

[7] 姚新生，陈英杰．超导核磁共振波谱分析．北京:中国医药科技出版社，1991
[8] 于德泉，梁晓天．核磁共振谱在中草药化学成分结构测定中的应用．中草药现代研究(仪器分析卷)．北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1999
[9] 宁永成．有机化合物结构鉴定与有机波谱学(第二版)．北京：科学出版社，2000
[10] Piantini U, Sorensen O W, Ernst R R. J Am Chem Soc, 1982, 104:6800~ 6801
[11] Shaka, A J, Freeman R. J Magn Reson, 1983, 51:169~ 173
[12] Muller N, Ernst R R, Wuthrich K. J Am Chem Soc, 1986, 108:6482~ 6492
[13] Sorensen O W, Freeman R. J Magn Reson, 1982, 46:180~ 184
[14] Gary E Martin, Ronald C Crouch. J Nat Prod, 1991, 54(1):1~ 70
[15] Bax A, Subramanian S. J Magn Reson, 1986, 67:565
[16] Bax A, Summers M F. J Am Chem Soc, 1986, 108:2093
[17] Davis D G, Bax A. J Am Chem Soc, 1985, 107:2821~ 2823
[18] Edwards M W, Bax A. J Am Chem Soc, 1986, 108:918~ 923
[19] Bax A, Davis D G. J Magn Reson, 1985, 63:207~ 213
[20] Kessler H, Griesinger C. J Am Chem Soc, 1984, 106:607~ 609
[21] Nakanishi K, Solomon P H. Infrared Absorption Spectroscopy. San Francisco:Holden-Day Inc, 1977
[22] Coleman P B. Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis. Boca Raton: CRC Press, 1993
[23] Smith R M, Busch K L. Understanding Mass Spectra—A Basic Approach. New York: John Wiley & Sons, 1999
[24] Busch K L, Glish G L, Mcluckey S A. Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, Techniques and Application. New York:VCH Publisher, 1988
[25] Nakanishi K et al. Natural Products Chemistry. New York:Academic Press, 1974~ 1983
[26] 丛浦珠．质谱学在天然有机化学中的应用．北京:科学出版社，1987
[27] 应百平等．化学学报，1988，46:85~ 86
[28] 徐任生．天然产物化学．北京:科学出版社，1993
[29] 龚运淮．天然有机化合物的核磁共振化学位移．昆明:云南科技出版社，1986
[30] 姚新生，陈英杰等．超导核磁光振波谱分析．北京:中国医药科技出版社，1991

第四章　生　物　碱

第一节　概　　述

生物碱一般是指植物中的含氮有机化合物(蛋白质、肽类、氨基酸及维生素 B 除外)。现在,除植物以外,人们从海洋生物、微生物、真菌及昆虫的代谢产物中发现了不少含氮化合物。有时也称它们为生物碱。因此广义地讲,生物界所有含氮的有机化合物都可称为生物碱。

生物碱是科学家们研究得最早的一类有生物活性的天然有机化合物。在我国,赵学敏在《本草纲目拾遗》中记载,17 世纪初《白猿经》即记述了从乌头中提炼出砂糖样毒物作箭毒用,用现代的经验分析推测,它应该是乌头碱。在欧洲,1806 年德国科学家 Sertürner 第一次从鸦片中分离得到了吗啡,因它具有碱性,曾称之为植物碱(the vegetable alkalis)。不久以后,1810 年西班牙医生 Gomes 从金鸡纳树皮中分得结晶 Cinchonino,后来证明主要是奎宁(quinine)与辛可宁(cinchonine)的混合物。1819 年,Weissner 把这类植物中的碱性化合物统称为类碱(alkali-like)或生物碱(alkaloid)。生物碱一名沿用至今。

生物碱类化合物大多具有生物活性。这类化合物往往是许多药用植物,包括许多中草药的有效成分。例如,阿片中的镇痛成分吗啡,止咳成分可待因,麻黄的抗哮喘成分麻黄碱,颠茄的解痉成分阿托品,长春花的抗癌成分长春新碱,黄连的抗菌消炎成分黄连素(小檗碱)等。生物碱能与酸结合成盐而溶于水,容易被体内吸收。它们又大多具有复杂的化学结构。由于上述特点,生物碱一直吸引着有机化学家们研究的兴趣并经久不衰。到目前为止,已报道的并搞清化学结构的生物碱已达 4000 多种,并且还以每年约上百个的速度递增着。同时还发现了在植物中含量极微,化学结构复杂的含氮大环化合物,如具有抗癌活性的美登素,它的全合成也已报道。近年来生物碱的分离、结构鉴定与全合成工作依然是天然有机化学家的重要研究领域。

生物碱是许多药用植物与中草药的有效成分。在许多情况下,含量最高的生物碱往往是主要的有效成分,但也有例外,如百部为止咳、杀虫中药,但百部生物碱只有杀虫作用,其止咳作用尚未见报道。又如乌头碱是乌头的主要成分,但它的强心止痛成分并不是乌头碱,而是含量极微的去甲乌头碱(*dl*-demethyl-coclaurine 或 higenamine)。长春新碱与美登素也分别是长春花与美登木的微量成分。这种含量与生物活性的关系都是不能忽视的。

生物碱在植物中的分布较广，其中双子叶植物类的豆科（Leguminosae）、茄科（Solanaceae）、防已科（Manispermaceae）、罂粟科（Papaveraceae）、毛茛科（Ranurculaceae）和小檗科（Berbereaceae）等科属含生物碱较多。有的在根皮或根茎中含量较高，有的则主要集中于种子或果实。生物碱在植物中的含量高低不一，如金鸡纳树皮中含生物碱高达3%以上，而长春花中的长春新碱含量仅为0.0001%，美登木中美登素含量更微，仅0.000 02%。一般含量在0.1%以上就算比较高了。由于同一植物中的生物碱往往来源于同一个前体，因此它们的化学结构往往类似。同科同属中的生物碱也大多属于同一结构类型。因而研究生物碱结构时首先要鉴定植物品种并对同种同属植物中的生物碱情况有所了解，掌握有关它们的生源知识将有助于化合物的鉴别和结构推定；否则，会使研究工作走上弯路。由于中草药植物的品种、俗名与学名有不少混乱，在研究工作开始之前更需确切鉴定植物品种。例如，市售清风藤经鉴定为防已科的防已 *Sinomenium acutum* Rehd，其中主要含防已碱（sinomenine，又称清藤碱）与清风藤碱（sinoacutine），而真正的清风藤属清风藤科（Sabiaceae），并不含生物碱。

由于植物的科属是按形态分类的，而生物碱则是它们的内在成分，有时并不能仅仅根据植物的科属而预言它们所含的生物碱成分。这二者之间没有绝对的相关性。例如，茜草科的吐根含吐根碱（emetine）高达2%，而同科的栀子、茜草则不含生物碱。

生物碱是天然有机化合物中最大的一类化合物。各类生物碱的结构千差万别，变幻无穷。科学家们在阐明化学结构的同时也研究它们的结构与疗效的关系，并进行结构改造，以寻求疗效更高、结构更为简单并且易于大量生产的新型化合物。例如，人们对吗啡（**1**）的研究发展了异喹啉类生物碱的研究，并导致镇痛药哌替啶（杜冷丁，dolantin，**2**）的发现。又如可卡因（cocaine，**3**）的研究发展了莨菪类生物碱化学研究并导致局部麻醉药普鲁卡因（procaine，**4**）的产生。

1　　**2**

3　　**4**

生物碱在植物体内一般被认为是次级代谢产物,起着保护或促进植物生长与代谢的作用。但它们的真正作用仍有争论,因为一些不含或微含生物碱的植物或生物同样生长发育良好。因此生物碱在生物体内的功能有待今后研究解决。

第二节　生物碱的性质、鉴别与提取分离

生物碱大多为无色结晶性化合物(少数为液体),有明显的熔点与旋光,味苦,易溶于有机溶剂,一般不溶于水。除酰胺生物碱外,大多为碱性。碱性强弱不等,一般能与无机酸或有机酸成盐而溶于水,但生物碱与某些特殊的无机酸(如硅钨酸、磷钨酸)及一些有机酸(如苦味酸等)成盐后不溶于水,常利用此性质鉴别和分离生物碱。酚性生物碱也能溶于碱水溶液,因而具有两性反应。例如,吗啡既能与酸结合成盐又能与苛性碱成盐。季铵盐类生物碱一般能溶于水,属水溶性生物碱,提取时应特别注意。

生物碱与许多试剂显不同的颜色,常用以鉴别一些特定的生物碱,见参考书目[1]。

鉴别生物碱常用的试剂为碘化铋钾(dragendorff)试剂。其配制方法:溶液Ⅰ为0.85g次硝酸铋溶于10mL冰醋酸及40mL水中;溶液Ⅱ为8g碘化铋钾溶于20mL水中。取Ⅰ、Ⅱ等体积混合液1mL与2mL乙酸、10 mL水混合即可用于显色试验。加入该试剂的含生物碱试液显棕黄色。

生物碱在植物体内常与有机酸(如咖啡酸、枸橼酸、草酸、罂粟酸等)结合成盐。所以提取生物碱时,生药粉末可直接用乙醇、稀乙醇(60%~80%)、水或酸水(一般用0.5%~1%硫酸或乙酸)浸泡,渗漉或加热提取。提取液蒸去水或乙醇后,将所得胶质用2%左右稀酸水提取生物碱。如果用稀醇提取,则所得浓水液加酸酸化,滤清酸水,用乙醚、氯仿洗去油脂,酸液用氨水、碳酸钠或石灰溶液碱化,游离出来的生物碱分别用乙醚、氯仿提取,即得总生物碱。如果含有水溶性生物碱,则留在溶剂提取后的水溶液中。这个方法所得的生物碱含杂质较多,但用乙醇比较经济、安全,所以适用于工业生产。也可将稀醇提取液通过大孔树脂柱吸附,而后用水洗净柱体,再用稀酸洗脱,浓缩可得总碱。如果用不同浓度的醇洗脱,分别浓缩,则可初步分离总碱。

生物碱也可用氯仿、二氯甲烷或苯等与水不相混溶的溶剂提取。提取时应先将生药粉末与少量碱水(如1%左右氨水、碳酸钠或石灰水溶液)拌匀或磨匀至湿润为止,使生物碱转成游离状态,继续用与水不相混溶的有机溶剂浸泡或渗漉(溶剂用量一般约为生药量的10倍),浸出液中的生物碱用稀酸水(如1%~2%盐酸)提取3~5次,至提取液不含生物碱为止。这时生物碱与酸成盐而转溶于酸水。酸水液滤清后,用乙醚或氯仿洗涤几次以除去一些脂溶性杂质,但有些生物碱盐也能溶于氯仿,因此含生物碱的氯仿洗涤液需再次处理。此后,酸水加碱水碱化,如有

沉淀或结晶析出,滤出重结晶。碱水液先用乙醚,后用氯仿等溶剂分别提取。

弱碱性生物碱在植物中往往以游离状态存在,因此可以用苯、氯仿等有机溶剂直接提取。强碱仍以盐的状态留在植物体内。提取前应先用适量水湿润生药,使植物细胞膨胀后再用有机溶剂提取,以提高提取效率,或用稀的有机酸,如柠檬酸水等湿润生药,以便使一些中等强度的碱也能成盐而留在植物体内,再用有机溶剂提取。提取液经酸水抽提,酸水液碱化,氯仿抽提即得弱碱部分的总碱。如果生药用水或稀醇提取,浓缩提取液,则因生药中常含一些有机酸而使浓缩液呈弱酸性,用氯仿等有机溶剂振摇,即可将游离弱碱提出(如喜树渗滤液浓缩后,pH 为 5.4,直接用氯仿可提取到喜树碱)。

水溶性生物碱和季铵碱不能被一般有机溶剂从水溶液中提出。可先加酸使溶液呈酸性,再通过阳离子交换树脂提取,也可用丁醇或戊醇等从碱水溶液中直接萃取,如益母草中的水溶性成分益母草碱甲就是用戊醇提出的。

挥发性生物碱(如麻黄碱)可以用水蒸气蒸馏法提取,而容易升华的生物碱可用升华法提取(如将茶叶末直接加热升华后,冷凝即得咖啡碱)。现在超临界流体(常用二氧化碳等)提取由于高效、快捷,也已在国内开始应用,如用 CO_2 流体从延胡索中萃取延胡索乙素、从洋金花中萃取东莨菪碱等。但这需要专门设备,由于在高压下进行,技术要求高,一时难以普及。

用上述方法提取所得的总生物碱,应先用薄层层析检测含多少生物碱,各组分的大致比例,然后再选用各种层析法分离与纯化。具体方法见参考书目[2]及其他有关书籍。

第三节 生物碱的分类

由于生物碱包括了一切天然有机物中的含氮化合物,一般按化合物结构类型或者生物合成途径进行分类。然而由于新型化合物不断涌现,老的分类方法经常被新型化合物的出现而冲破,现在已越分越细,如异喹啉生物碱是一个大类,目前已细分为吗啡类(morphines)、苄基异喹啉类(benzylisoquinolines)、阿扑芬类(aporphines)、普鲁托品类(protopines)、双分子阿扑芬类(dimeric aporphines)、双苄基异喹啉类(bisbenzylisoquinolines)等。

鉴于本书主要目的是介绍各类化合物的化学,不是包罗万象的百科全书,因此没有罗列所有类别的化合物。本章选择一些常见的生物碱结构类型,如异喹啉类、喹啉类、吡咯烷类、吲哚类等,选择我国天然产物并结合我们的工作加以介绍。

一、异喹啉类生物碱

异喹啉生物碱是最大的一类生物碱,以异喹啉或四氢异喹啉为母核,根据连接

基团的不同,又可分为九类。

1. 单异喹啉(isoquinoline)类生物碱

最简单的为鹿尾草(*Salsola richteri* Karelin)中的降血压成分鹿尾草碱(salsoline,**5**)与鹿尾草定(salsolidine,**6**)。

HO MeO NH CH_3 **5**　MeO MeO NH CH_3 **6**

2. 苄基异喹啉(benzylisoquinoline)类生物碱

一般的异喹啉核的1位接有苄基,如阿片中有解痉作用的罂粟碱(papaverine,**7**)、乌头中的强心成分去甲乌药碱(demethylcoclaurine,**8**),也包括含内酯环的那可汀(narcotine,**9**)等。

MeO MeO N MeO OMe **7**　HO HO NH HO **8**　O O NH H H O O OMe OMe **9**

3. 双苄基异喹啉(bisbenzylisoquinoline)类生物碱

由两个苄基异喹啉在酚羟基位置以醚键方式相连。有单醚、双醚和三醚等,如以喹啉环为头,苄基为尾,则有尾尾相连、头尾相连、头头相连等多种形式。如莲子芯中的莲心碱(liensinine)(**10**)属头尾相连的单醚类生物碱。

CH_3 N H C H_2 OH MeO OMe HO C H_2 H N CH_3 MeO O **10**

4. 阿扑芬(aporphine)类生物碱

阿扑芬类生物碱由苄基异喹啉生物碱中两个苯环相连组成四环化合物,如千金藤碱(stephanine,**11**)、广玉兰中的季铵盐生物碱木兰碱(magnoflorine,**12**)。

11　　　　**12**

5. 原小檗碱(protoberberine)类生物碱

原小檗碱类生物碱为两个异喹啉环的稠合,如黄连与三棵针等植物所含的抗菌成分小檗碱(黄连素,berberine,**13**)、延胡索中的镇静止痛成分延胡乙素(四氢巴马汀,tetrahydropalmatine,**14**)。

13　　　　**14**

6. 普鲁托品(protopine)类生物碱

延胡索中常见的普鲁托品(**15**)、隐品碱(cryptopine,**16**),它们实际上是含羰基的小檗碱开环化合物。

15　　　　**16**

7. 吐根碱(emetine)类生物碱

吐根碱类生物碱为异喹啉环带苯骈喹啉啶(benzoquinoline)环。吐根碱(**17**)为吐根(*Uragoga ipecacuanha* Baill.)中治阿米巴痢疾的有效成分。

17

8. α-萘菲啶(α-naphthaphenanthridine)类生物碱

如博落回[*Macleaya cordata* (Will) R. Br.]中的血根碱(sanguinarine,**18**)与白屈菜红碱(chelerythrine,**19**)。

18　　**19**

9. 吗啡(morphine)类生物碱

吗啡类生物碱如 **20** 所示。

20

二、喹啉类生物碱

喹啉类生物碱的基核是喹啉环。最简单的如茵芋(*Skimmia reevesiana* Fort.)叶所含的茵芋碱(skimmianine,**21**),熔点 194℃,具有镇静止痛作用;白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz..)根所含的白鲜碱(dictamnine,**22**),熔点 133℃,它们是呋喃喹啉衍生物。

21　4 = 7 = 8 = OCH_3

22　4 = OCH_3,7 = 8 = H

其他如奎宁(quinine,**23**)、喜树碱(camptothecine)均属喹啉类生物碱。喹啉环的紫外光谱最大吸收λ_{max} (ε)为:230nm(37 000)、270nm(3600)、314nm(2750);红外光谱吸收与一般的苯核吸收相似(1400~ 1600 cm^{-1})。

喹啉类生物碱中最重要的一类是金鸡纳生物碱(cinchona alkaloid)。金鸡纳是茜草科各种 *Cinchona* 属木本植物的总称,最初在南美被发现可用以治疗疟疾而受到重视,以后发现它的有效成分是奎宁(**23**),同时又发现同科 *Remijia* 与 *Cuprea* 二属植物也含奎宁,有的含量高达 3%,因而这三属植物被广泛引种于南美及东南亚各国地区。

奎宁是继吗啡后研究得最早的生物碱之一,早在 1792 年,Fourcroy 即分离得到粗品。以后西班牙医生 Gomes 于 1810 年将苛性钾加入金鸡纳树皮的乙醇溶液中,第一次分离得到结晶性物质,称之为"Cinchonino"。1820 年,法国化学家 Pelletier 与 Caventou 从 *Cinchona condaminea* 树皮中分离得到 Cinchonino,它经进一步分离纯化,分离得到奎宁(**23**)与辛可宁(**27**)两个纯品[1],从此许多化学家对各种金鸡纳 *Cinchona*、*Remijia* 与 *Cuprea* 植物中的生物碱进行了系统的研究,从中先后分得30 多个生物碱,大多为奎宁类衍生物,其中主要的金鸡纳生物碱见表 4 - 1。

表 4 - 1　主要的金鸡纳生物碱

名　称		分子式	熔点/℃	比旋光度 $[\alpha]_D$/(°)
奎宁	quinine (**23**)	$C_{20}H_{24}O_2N_2$	175	- 158(EtOH)
奎尼定	quinidine conchinine (**24**) β-quinine	$C_{20}H_{24}O_2N_2$	173. 0	+ 255(EtOH)
表奎宁	epiquinine (**25**)	$C_{20}H_{24}O_2N_2$	油状	43
表奎尼定	epiquinidine (**26**)	$C_{20}H_{24}O_2N_2$	113	+ 102(EtOH)
辛可宁	cinchonine (**27**)	$C_{19}H_{22}ON_2$	264	+ 224(EtOH)
表辛可宁	epicinchonine (**28**)	$C_{19}H_{22}ON_2$	83	+ 120. 3(EtOH)
辛可尼定	cinchonidine (**29**)	$C_{19}H_{22}ON_2$	205	- 110(EtOH)
表辛可尼定	epicinchonidine (**30**)	$C_{19}H_{22}ON_2$	104	62. 8(EtOH)

23　奎宁　R = OCH_3
29　辛可尼定　R = H

24　奎尼定　R = OCH_3
27　辛可宁　R = H

25 表奎宁 R = OCH_3
30 表辛可尼定 R = H

26 表奎尼定 R = OCH_3
28 表辛可宁 R = H

三、吡咯烷类生物碱

1. 简单的吡咯烷生物碱

简单的吡咯烷(pyrrolidine)生物碱如古豆碱(hygrine,**31**),沸点为 195℃,$[\alpha]_D$ 为 0°,与另一种红古豆碱(cuscohygrine,**32**),沸点为 188~ 170℃,$[\alpha]_D$ 为 0°,都是从古柯科植物古柯(*Erythroxylon coca* Lam.)叶中分出的液体生物碱。

31

32

新疆党参[*Codonopsis clematidea* (Schrenk) Clarke]中的党参碱(codonopsine,**33**),熔点为 150℃,$[\alpha]_D$ 为 -16°(MeOH)。

33

2. 双稠吡咯烷类生物碱

双稠吡咯烷(pyrrolizidine)类生物碱由叔氮稠合两个吡咯烷而成。例如,大叶千里光碱(macrophylline,**34**),分子式为 $C_{13}H_{21}O_3N$,熔点为 44℃,$[\alpha]_D$ 为 +35°(EtOH);从农吉利(*Crotalaria sessiflora* L.)中分出的野百合碱(又称农吉利碱,monocrotaline,**35**),分子式为 $C_{16}H_{23}O_6N$,熔点为219℃,$[\alpha]_D$ 为 -55°($CHCl_3$);从阔叶千里光(*Senecio platyphyllus* D. C.)中分得的阔叶千里光碱(platyphylline,**36**),分子式为$C_{18}H_{27}O_5N$,熔点为 129℃,$[\alpha]_D$ 为 -56°($CHCl_3$)。上述物质都是由一个有机酸与双稠吡咯啶衍生的氨醇(或称次碱)以酯的形式连接而成。除少数如 **34** 为单酯外,大多为双酯,如 **35**、**36** 等。大多数氨醇部分为阔叶千里光次碱(platynecine,**37**),也有些是大叶千里光次碱(macronecine,**38**),它们是 C-1 差向

异构体。

34　35　36

37　38

3. 吲哚里西定类生物碱

以叔氮稠合吡咯烷与哌啶环而组成的吲哚里西定(indolizidine)环,如白牵牛碱(ipalbidine,**39**)、一叶萩碱(securinine,**40**)等。

39　40

4. 莨菪烷类生物碱

莨菪烷(tropane)是由吡咯烷与哌啶(piperidine)骈合而成的杂环,这类生物碱中常见的是与有机酸组成酯的阿托品(atropine,**41**)类生物碱。

41

5. 百部生物碱

由各种百部根中分得的生物碱大多含有吡咯烷环,因此也纳入吡咯烷类生物碱。如原百部碱(protostemonine,**42**)和对叶百部碱(tuberostemonine,**43**)。

42 **43**

四、吲哚生物碱

自 20 世纪 50 年代发现降低血压有效成分利血平(reserpine,**44**)与治疗白血病高效药物长春碱(vinblastine,VLB,**45**)与长春新碱(vincristine,VCR,**46**)以来,吲哚类生物碱的研究吸引了许多国家的有机化学家,先后报道了 400 多个吲哚类生物碱的分离、结构与合成研究,曾压倒了所有其他生物碱与天然产物的化学研究。吲哚生物碱的紫外光谱吸收λ_{max}分别为:①吲哚环 200nm、280~ 290nm;②二氢吲哚特征为 250nm 特强,它是 *N*,*N* -二甲苯胺的吸收;③羟吲哚的吸收在 240 nm 左右,与乙酰苯胺相同;④ *N*-酰吲哚在 280nm 有强吸收,其次在 257nm、290nm 处有吸收,这主要是由于 *N*-酰基与苯环共轭所致。

44

45 R=CH_3
46 R=CHO

通常,紫外光谱吸收是诊断吲哚类型的重要手段;红外光谱吸收峰 ν_{max} 为 1450 cm^{-1}、1590cm^{-1}、1620cm^{-1} 及 340cm^{-1}(尖峰,NH);^{1}H-NMR主要显示各种芳香质子信号。

最简单的吲哚类生物碱有相思豆(*Abrus precatorius* L.)中的相思豆碱(abrine,**47**),熔点为 297℃;骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)种子中的骆驼蓬碱(harmaline,**48**),熔点为 231℃;去氢骆驼蓬碱(harmine,**49**),熔点为 261℃等。

47 **48** **49**

第四节　某些生物碱的结构研究

由于生物碱结构类型繁多,在研究结构前应首先对同种同属植物中的生物碱结构有所了解,做到心中有数,同时根据该化合物高分辨质谱给定的分子式,与同属植物已知生物碱进行比较,如有可能为新生物碱,再进行氢谱、碳谱及二维核磁谱特别是 HMBC、HMQC 谱解析结构,下面分类做介绍。

一、百部生物碱

百部(*Stemona*)为传统中药之一,用以止咳与杀虫,野生于长江以南各省区。常见的有对叶百部(*Stemona tuberosa* Lour)、直立百部[*S. sessilifolia* (Miq.) Miq.]、蔓生百部(*S. japonica* Miq.),还有细花百部(*S. parviflora* C. H. Wright, 生长于海南岛)等多种。

20 世纪 30 年代初,德国的 Schild 等[2] 曾通过 Hofmann 降解、溴氰化、氧化、还原等化学方法确定了对叶百部碱(tuberostemonine)的官能团。50 年代,加拿大学者 Götz 和 Boyri 等[3,4] 继续对该化合物做了大量的化学研究,并应用当时新发展起来的 UV、IR、MS、NMR 等波谱技术方法,首次确定了其平面结构。Edwards[5] 在 60 年代通过 X 射线衍射实验最终确定了其立体构型。我国化学家朱任宏[6] 对直立百部(*S. sessilifolia*)和对叶百部(*S. tuberosa*)的化学成分进行了细致的研究,分离得到直立百部碱(sessilistemonine,即原百部碱)和对叶百部碱(tuberostemonine),并制得 HI 和 $HClO_4$ 盐。进入 80 年代以后,随着波谱技术的迅速发展,百部生物碱结构鉴定工作在我国有了很大的进展。郭伽等[7,8] 从四川产对叶百部和甘肃产一百部中分离得到了百部新碱(stemoninine),并利用化学衍生化物、^{1}H-NMR 及 ^{13}C-NMR 及 2D-NMR 推导了结构。徐任生等[9,10] 首次应用 2D-NMR 波谱技术确定了云南对叶百部中两种结构复杂的新生物碱,即滇百部碱(stemotinine)和异滇百部碱(isostemotinine)的化学结构,其结构与 X 射线衍射测定结果一致[11],从而推动了现代波谱技术在百部生物碱结构鉴定中的应用。林文翰[12~19]、叶阳等[20~23] 系统研究了国产六种百部科植物的生物碱组成,从中分离出大量新生物碱,用现代波谱技术确定了结构, 发现了一些新的生物碱骨架,部分结构经 X 射线衍射证实(表 4-2)。这些生物碱的结构大多含有 1~2 个α-甲基-γ-内酯环,而氮则以叔胺形式存在于氮杂薁(azaazulene)环,分子中多含有一个α-甲基-γ-内酯环,连接在吡咯烷α-位,可分成原百部碱(protostemonine,**42**)、对叶百部碱(tuberostemonine,**43**)、狭叶百部碱(maistemonine,**50**)、细花百部碱(parvistemonine,**51**)、百部新碱(stemoninine,**52**)、百部叶碱(stemofoline,**53**)、金刚大碱(croomine,**54**)七种结构类型,详见百部生物碱有关综述[24~26]。百部中的主要生物碱

成分见表4-2。

表4-2 百部中的主要生物碱成分[25]

生物碱	分子式	熔点/℃	$[\alpha]_D$
原百部碱(protostemonine,**42**)	$C_{22}H_{31}O_6N$	172	+170°(EtOH)
对叶百部碱(tuberostemonine,**43**)	$C_{22}H_{33}O_4N$	88	-47°($CHCl_3$)
狭叶百部碱(maistemonine,**50**)	$C_{23}H_{29}O_6N$	205~207	
细花百部碱(parvistemonine,**51**)	$C_{22}H_{33}O_5N$	296	
百部新碱(stemoninine,**52**)	$C_{22}H_{31}O_5N$	113~115	-110°(EtOH)
百部叶碱(stemofoline,**53**)	$C_{22}H_{29}O_5N$	87~89	+273°(MeOH)
金刚大碱(croomine,**54**)	$C_{18}H_{23}O_4N$	沸点210~215(2×10^{-3}mmHg[1]))	+7.8°($CHCl_3$)
百部碱(stemonine,**55**)	$C_{17}H_{25}O_4N$	151	-114°(EtOH)
百部宁(stenine,**56**)	$C_{17}H_{27}O_2N$	65~67	-30°(MeOH)
氧代对叶百部碱(oxotuberostemonine,**57**)	$C_{22}H_{31}O_5N$	222	
蔓生百部碱(stemonamine,**58**)	$C_{18}H_{23}O_4N$	172~174	
异蔓生百部碱(isostemonamine,**59**)	$C_{18}H_{23}O_4N$	165~190	
百部定碱(stemonidine,**60**)	$C_{18}H_{29}O_5N$	119	-5.4°(Me_2CO)
滇百部碱(stemotinine,**61**)	$C_{18}H_{25}O_5N$	207~208	+91.7°(MeOH)
异滇百部碱(isostemotinine,**62**)	$C_{18}H_{25}O_5N$	245~246	+47.5°(MeOH)

1) 1mmHg = $1.333\ 22\times10^2$ Pa。

50 **51** **52**

53 **54** **55**

56 **57** **58** **59**

(一) 滇百部碱与异滇百部碱

1. 滇百部碱

滇百部碱的分子式为 $C_{18}H_{25}O_5N$；HRMS M^+ m/z 为 335.1751；紫外无吸收；红外 ν_{max} 为 $1764cm^{-1}$、$1190cm^{-1}$（γ-内酯环），无 NH、OH 和双键吸收；^{13}C-NMR为 δ179.2ppm、δ179.7ppm，两个信号表明分子内含两个γ-内酯环、一个醚键与叔氮，按不饱和数 7 计算，推测应是一个五环化合物。质谱中 $M^+-C_5H_7O_2$（M^+-99）碎片是所有连接于吡咯烷基（pyrrolidine）环α-甲基-γ-内酯环的百部生物碱的特征信号。根据^1H-NMR、二维谱及去偶技术推定了它的结构如 **61** 所示。H-10α，δ2.61ppm 远较 H-10β，δ1.70ppm 为低，是因为受四氢吡喃环各向异性的效应，因而螺旋γ-内酯环向上，鉴于质子信号 H-5α 与 H-7α、H-6α H-8α 之间有远距离 W 形偶合（J = 1.4 Hz），因而四氢吡喃环为椅式构型；另一个α-甲基-γ-内酯环则向下，其立体构型则根据 NOE 确定如 **61** 所示。5α-H 与 5β-H、3α-H 及 6-H 间的 NOE 增益进一步证实了这一构型。

60　**61**　**62**

2. 异滇百部碱

分子式与滇百部碱相同；^1H-NMR、红外光谱也类同，但 H-10α，δ2.10ppm 比滇百部碱的相应质子（δ2.61ppm）信号高 δ0.51ppm。推测螺旋内酯环向下，四氢吡喃环呈船式构型，由于失去氧环效应，因而此质子信号偏高，并与 H-10β、δ1.71ppm 接近，如 **62** 所示。

滇百部碱及异滇百部碱的^1H-NMR谱数据如表 4-3 所示。

1982 年首次用 NMR 技术阐明这一类复杂的结构，该结构已由麦松威采用 X 射线衍射法证实[11]。目前二维 NMR 如 HMBC、HMQC、ROESY 等技术已普遍应用于这类复杂生物碱结构的解析。

与滇百部碱同属一类结构的还有从百部科黄金叶钩吻属金刚大（*Croomia japonica*）中得到的金刚大碱（croomine，**54**），以及分布于蔓生百部和直立百部中的百部定碱（stemonidine，**60**）。在推导滇百部碱时，徐任生曾推定了百部定碱的结构[9]。后经 X 射线衍射法证实，**60** 与 stemospironine 为同一化合物[27, 28]。

表 4-3 滇百部碱及异滇百部碱的 ^1H-NMR 谱数据

序号	滇百部碱 stemotinine (**61**)	异滇百部碱 isostemotinine (**62**)
1α, β	1.86m 和 1.91 m	1.88m 和 1.92 m
2α, β	1.72m 和 1.98 m	1.60m 和 2.15 m
3α	2.86 ddd 10.8 (2β), 8.8 (14β), 5.8 (2α)	2.93 ddd 10.8 (2β), 7.8 (14β), 6.1 (2α)
5α	3.00 ddd 10.7 (5β), 6.3 (6), 1.4 (7α)	3.04 dd 10.4 (5β), 6.3 (6)
5β	3.22 d 10.7 (5α)	3.20 d 10.4 (5α)
6	4.59 m 6.3 (5α), 2.0 (7α), 2.0 (7β), 1.4 (8α)	4.68 ddd 6.3 (5α), 2.0 (7α), 2.0 (7β)
7α	1.81 m 13.5 (8β), 12.6 (7β), 5.9 (8α)	
7β	1.62 bdd 12.6 (7α), 5.4 (8β), 1.8 (8α)	
8α	1.55 ddt 13.5 (8β), 5.9 (7α), 1.8 (7β), 1.8 (6)	
8β	2.34 dt 13.5 (8α), 13.5 (7α), 5.4 (7β)	
10α	2.61 dd 14.6 (10β), 11.6 (11)	2.10 dd 13.1 (10β), 10.0 (11)
10β	1.70 dd 14.6 (10α), 6.3 (11)	1.71 dd 13.1 (10α), 12.6 (11)
11	2.81 ddq 11.6 (10α), 7.7 (11-Me), 6.3 (10β)	2.80 ddq 12.6 (10β), 10.0 (10α), 7.7 (11-Me)
11-Me	1.34 d 7.7 (11)	1.28 d 7.7 (11)
14β	4.26 ddd 11.3 (15α), 8.8 (3α), 5.4 (15β)	4.14 ddd 11.3 (15α), 7.8 (3α), 5.4 (15β)
15α	1.48 ddd 12.6 (16β), 12.6 (15β), 11.3 (14β)	1.58 ddd1)
15β	2.36 ddd 12.6 (15α), 9.0 (16β), 5.4 (14β)	2.36 ddd1)
16β	2.67 ddq 12.6 (15α), 9.0 (15β), 7.5 (16-Me)	2.66 ddd1)
16-Me	1.26 d 7.5 (16β)	1.28 d1)

1) *J* 值与 **61** 相同。

3. 细花百部碱

从海南岛产细花百部(*Stemona parviflora* C. H. Wright)中分得细花百部特有的一类生物碱结构,目前已经分离得到 4 种同类结构。细花百部碱(parvistemonine,**51**),$C_{22}H_{33}O_5N$,熔点 296℃,M^+ (*m/z*) 391.2316。红外 ν_{max} 1765cm^{-1}、1775cm^{-1}、1172cm^{-1} 和 1120cm^{-1}。其结构通过去偶、^1H-^1H 相关谱、NOE 相关谱以及 ^1H-^{13}C 相关谱等技术推定,并经其氢溴酸盐的 X 单晶衍射方法进一步确证。其绝对构型为 3*S*, 9*R*, 9a*S*, 10*S*, 11*R*, 12*R*, 13*R*, 16*S*, 18*S*, 20*S*[12]。从其根部还分离得到了脱氢细花百部碱(bisdehydroparvistemonine, **63**)和细花百部酰胺

(parvistemoline,**64**)[13]。一般 C-3 位连接有一个α-甲基-γ-内酯环,所以在 EIMS 中也有特征的[M - 99]$^+$ 碎片峰。另外,这类生物碱的 C-9 位连接有一个α-甲基-γ-内酯环骈α-甲基呋喃环侧链,这些结构特征在 IR 谱中也有体现(ν_{max} 1775 ~ 1785cm^{-1}、1350 ~ 1450cm^{-1}、1150 ~ 1200cm^{-1});在^{1}H-NMR 高场(δ 0.8 ~ 2.0ppm, d, J = 7.0Hz, Me-15, Me-17, Me-22)中有 3 个叔甲基双峰信号。

63 **64**

从细花百部茎叶部位得到 12α-甲氧基细花百部碱(12α-methoxylparvistemonine,**65**),$[\alpha]_D$ 为 +80.6°,紫外最大吸收在 λ_{max} 234nm,EIMS 提示其相对分子质量为 421,HREIMS 进一步确定其分子组成为 $C_{23}H_{35}NO_5$(m/z 为 421.2488),不饱和度为 7。EIMS 中的碎片峰 135 提示分子中可能含有百部生物碱氮杂薁环的基本骨架结构,其基峰为 322 [M - 99]$^+$,提示 A 环 3-位接有一个α-甲基-γ-内酯环。IR 中 ν_{max} 为 1778cm^{-1}、1775cm^{-1}、1189cm^{-1}、1050cm^{-1} 以及^{13}C-NMR谱中的两个季碳(δ 179.7ppm、δ 176.3ppm)提示分子中含有两个 γ-内酯环;^{13}C-NMR、DEPT135 以及^{1}H-NMR谱中提示分子中含有 3 个叔甲基(δ 1.34ppm, d, Me-15; δ 1.19ppm, d, Me-17; δ 1.25ppm, d, Me-22),1 个甲氧基(δ 3.35ppm, s, MeO-23),7 个 CH_2,9 个 CH 和 3 个季碳。另外,特征偕二质子信号 5-CH_2(δ 3.37ppm, m, H-5α; δ 2.58ppm, m, H-5β)也说明了氮杂薁环的基本骨架结构的存在。根据生源关系以及^{1}H-NMR相关数据比较,发现该化合物比细花百部碱(**51**)多一个甲氧基信号,而未出现 **51** 中 H-12 质子信号,其他信号基本一致。因此,推测该化合物可能为 12-位甲氧基取代的细花百部碱。该推断进一步得到 ^{1}H-^{1}H COSY、HMQC 以及 HMBC 相关信号的支持。归属的该化合物^{1}H-NMR 和^{13}C-NMR信号见表4 - 4,**65** 中 12-位甲氧基的α-构型由 NOESY 谱确定[28]。12α-甲氧基细花百部碱的^{1}H-^{1}HNMR、NOESY、HMBC、HMQC 相关谱如图 4 - 1~图 4 - 4 所示。

65

表 4-4　12α-甲氧基细花百部碱(**65**)的 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 数据及 HMBC 相关关系($CDCl_3$)

编号	^{1}H-NMR δ/ppm	J/Hz	^{13}C-NMR δ/ppm	HMBC(C→H)
1	1.40, m; 1.64, m		27.1 (t)	H-3, H-9
2	1.59, m; 1.75, m		26.9 (t)	
3	3.40, m		63.7 (d)	H-1, H-19
5	α 2.85, m; β 3.37, m		46.6 (t)	H-3
6	1.42, m; 1.70, m		24.8 (t)	H-8
7	1.38, m; 1.77, m		28.7 (t)	H-5, H-9
8	1.45, m; 1.91, m		26.9 (t)	H-6
9	2.15, ddd		39.0 (d)	H-1, H-7
9a	3.43, ddd		62.9 (d)	H-2, H-8, H-10
10	2.30, ddd		47.4 (d)	H-8, Me-17
11	4.60	4.3	86.4 (d)	H-16
12	—		110.3 (s)	H-16, MeO-23, Me-15
13	2.89, q	7.2	44.7 (d)	
14	—		176.3 (t)	H-11, Me-15
15-Me	1.34, d	7.2	10.0 (q)	
16	4.48, dq	6.7, 7.2	79.4 (d)	H-10, H-11
17-Me	1.19, d	6.7	19.4 (q)	H-10
18	4.18, m		83.4 (d)	H-2
19	1.55, m; 2.35, m		34.2 (t)	Me-22, H-20
20	2.59, m		35.0 (d)	
21	—		179.7 (s)	H-19, Me-22
22-Me	1.25, d	7.0	15.0 (q)	H-19, H-20
23-OMe	3.35, s		51.2 (q)	

二、喜树碱及其类似物

喜树碱是从我国特有植物珙桐科喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)中发现的抗癌活性成分,1966 年,Wall 等首先报道从喜树干中分得喜树碱 $C_{20}H_{16}N_2O_4$ (**66**),熔点 264~266℃,$[\alpha]_D$ 为 +40°,($CHCl_3$: MeOH 4 : 1)。并通过其碘乙酰衍生物的 X 射线衍射方法确定了它的结构,唯一的手性 C-20 为 *S* 型[29]。由于动物体内实验显示有较强的抗癌活性而被认为是有希望的抗癌药物。我们于 1969 年开始从国产喜树中分得喜树碱,以后又进一步分得 10-羟基喜树碱(**67**),$C_{20}H_{16}N_2O_5 \cdot H_2O$,熔点 266~267℃,$[\alpha]_D$ 为 -147°(吡啶),并首先投入生产,用于临床[30,31]。喜树碱在临床上用于治疗胃癌、膀胱癌、白血病等。但因有血尿、尿急、尿频等副作用而受到限制。10-羟基喜树碱则可用于治疗肝癌与头颈部肿瘤,副作用远比喜树碱为小。后来又发现喜树碱用黄曲霉菌 T-36 可选择性地氧化成 10-羟基喜树碱,

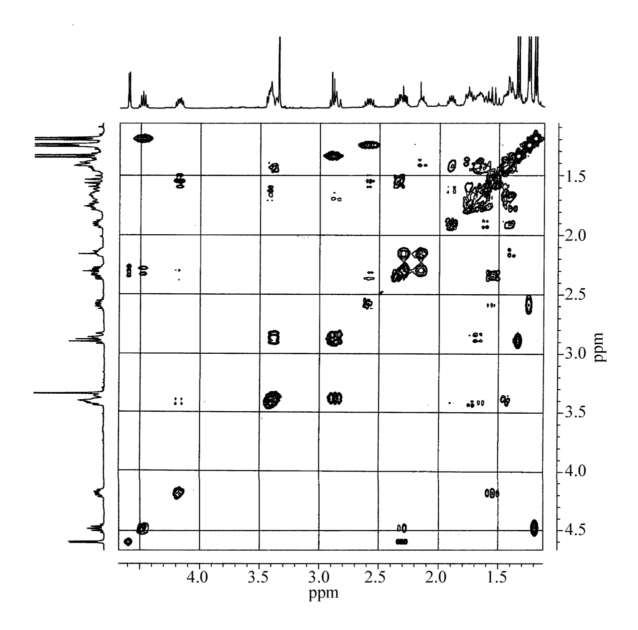


图 4-1　12α-甲氧基细花百部碱的¹H-¹H相关谱($CDCl_3$,400 MHz)

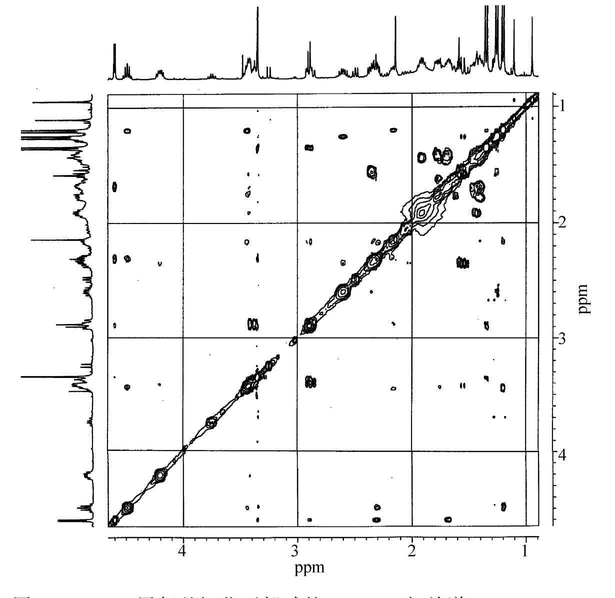


图 4-2　12α-甲氧基细花百部碱的 NOESY 相关谱($CDCl_3$,400 MHz)

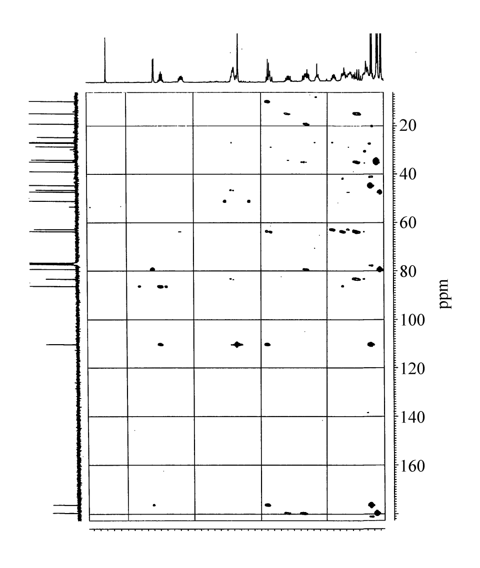


图 4－3　12α-甲氧基细花百部碱的 HMBC 相关谱（$CDCl_3$）

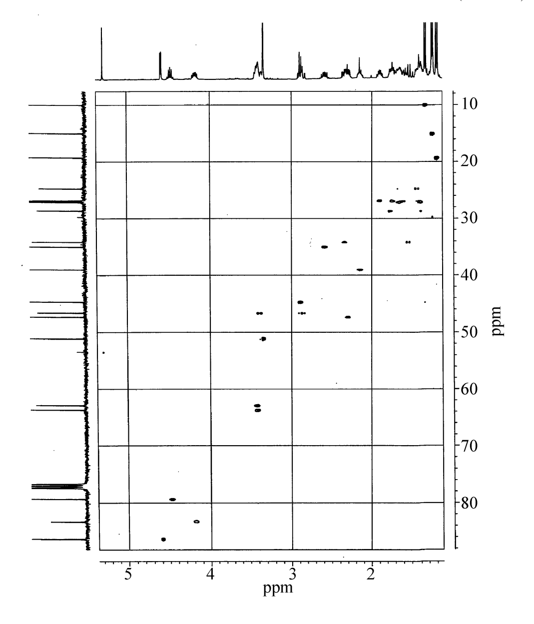


图 4－4　12α-甲氧基细花百部碱的 HMQC 相关谱（$CDCl_3$）

为大规模生产打下了基础[32]。

66　$R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$
67　$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH$
68　$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = OH$
69　$R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH$
70　$R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = OH$
72　$R_1 = R_2 = R_3 = H$

71

喜树碱在喜树枝、皮、根、根皮及果中的得率分别约为 0.004%、0.01%、0.01%、0.02% 及 0.03%，由于喜树果资源丰富，含喜树碱及 10-羟基喜树碱 (0.003%)高，因此被选作生产原料，同时从喜树果中还分得微量 10-甲氧基基喜树碱(**68**)、11-羟基喜树碱(**69**)与 11-甲氧基喜树碱(**70**)，它们的结构是通过与甲氧基吡咯[3，4]-并喹啉类似物(**71**)的^{1}H-NMR比较而解决的，对动物肿瘤都有强的抑制作用。此外，也分离得到无抗癌活性的去氧喜树碱(**72**)[30]。

喜树碱类生物碱是一类特殊的生物碱，是带有喹啉环的五环化合物，含 δ-内酰胺与 δ-内酯环，它们都属于中性乃至近酸性的化合物，无一般生物碱反应(与碘化铋钾试剂反应呈阴性)，也不能与酸成盐，不溶于一般有机溶剂与水，能溶于稀碱而开内酯环。因而与一般生物碱提取方法不同，可从乙醇提取液浓缩后的浓水液(pH 为 5.4)中用氯仿直接提取。提取物除去油状物而得的淡黄色粉末，经氯仿∶甲醇(1∶1)重结晶得喜树碱纯品。

鉴于喜树碱的喹啉环与不饱和内酰胺环之间有连续的共轭系统，因此，它为淡黄色结晶，其氯仿溶液有很强的荧光。紫外吸收 λ_{max} (lgε)：218nm(4.63)、254nm(4.53)、290nm(3.78)、370nm(4.35)。红外光谱 ν_{max}：有羟基(3440cm^{-1})、内酯(1760~1750cm^{-1})及不饱和内酰胺(1673cm^{-1})等吸收峰。以三氟乙酸为溶剂的^{1}H-NMR信号有 δ0.69ppm(3H，t，J = 7Hz，C_{18}—H)、δ1.72ppm(2H，q，J = 7Hz，C_{19}—H)、δ5.40ppm(2H，s，C_5—H)、δ5.18ppm、δ5.54ppm(2H，q，J = 16Hz，C_{17}—H)、δ7.66~8.14ppm(5H，m，$C_{9\sim12}$及C_{14}—H)、δ9.00ppm(1H，s，C_7—H)。

近年来由于发现喜树碱是 DNA 拓扑异构酶Ⅰ(Topoisomerase Ⅰ)的抑制剂，而不同于大多数为拓扑异构酶Ⅱ抑制剂的抗癌药，因而格外受到重视，同时发展了以增加水溶解度为主的类似物合成，由于 10-羟基喜树碱的活性高于喜树碱，因此结构修饰往往在 10-羟基喜树碱基础上进行。新的品种，如 9-二甲氨甲基-10-羟基

喜树碱、拓扑泰康(topotecan,**73**),已被美国 FDA 于 1996 年批准上市,由 Smithkline-Beecham(现为 GSK)公司生产。喜树碱(**66**)在乙酸中用 Adam's 铂催化氢化成 1,2,6,7-四氢喜树碱,再用乙酸铅氧化脱氢得 10-乙酰氧喜树碱和喜树碱的混合物。用乙酸水解混合物,制备型 HPLC 分离,所得 **67** 在 37%甲醛及 40%二甲胺水溶液中进行 Manich 反应,得 Topotecan[33]。它的盐酸盐有很好水溶性,溶液的酸性避免了因内酯开环而降低活性的可能。这种结构修饰方法简便,产物疗效好,毒性有可能降低。Topotecan 已被广泛用于治疗卵巢癌与小细胞肺癌。

1) HOAc, H_2/PtO_2, 0.1MPa
2) $Pb(OAc)_4$, HOAc
3) HOAc, H_2O

66 → **67**

CH_2O, $HNMe_2$
HOAc, EtOH

→ **73**

喜树碱-11(CPT-11)或依利诺泰康(irinotecan),即 7-乙基-10-[4-(1-哌啶)-1-哌啶]-酰氧基喜树碱[7-ethyl-10-[4-(1-peperidino)-1-peperidino]-carbonyloxy camptothecin],是另一个由 FDA 于 1996 年批准上市的喜树碱类似物。日本第一制药与美国 Pharmacia-Upjohn 公司分别生产,商品名为 Camptoser。将 **66** 混于丙醛、硫酸亚铁与浓硫酸混合液中,滴加 30%双氧水制成 7-乙基喜树碱(**75**),再于 30%双氧水和乙酸溶液中加热成氮氧化合物(**76**)。将 **76** 置于二氧环己烷及稀硫酸中进行光照(450W 汞灯)反应,制成 7-乙基-10-羟基喜树碱(**77**)。**77** 在吡啶中与 4-哌啶-哌啶酰氯反应生成(**74**)或将 **77** 溶于含三乙胺的二氧杂环己烷溶液中与光气作用,生成酰氯氧化物(**78**),它再与 4-哌啶-哌啶反应也得到 **74**[34]。研究者合成了一系列 **74** 类似物。动物试验表明还是 CPT-11 活性最强,且既可以用于静脉注射,又可用作口服。**74** 进入体内后在血液或肝脏中分解成代谢物 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38,**77**),这也可以理解为什么 CPT-11 在体外测试时对拓扑异构酶Ⅰ抑制率很低,而在体内活性很高,因为 CPT-11 实际上是 SN-38 的前药(pro-drug)。CPT-11 用于治疗卵巢癌及已转移的直肠结肠癌。

目前正在临床试用的还有 9-硝基喜树碱(9-nitrocamptothecin,9-NC,**79**)又称 Rubitecan,由美国 Super Gen 公司制成口服片剂试用于治疗直肠结肠癌及卵巢

癌，且对胰腺癌效果显著[35]。其他还有9-氨基喜树碱(**80**)、7-氰基喜树碱(**81**)正在临床试验中。

66 —(C_2H_5CHO, $FeSO_4$-H_2O_2, H_2SO_4(aq.), 77%)→ **75** —(H_2O_2, H_2SO_4, 78%)→ **76** —(1,4-二氧六环, $h\nu$, H_2SO_4, 49%)→ **77** —(Et_3N, $COCl_2$, 90%)→ **78**

77 —(80%)→ **74**；**78** —(80%)→ **74**

79　**80**　**81**

三、防己碱与清风藤碱

防己(*Sinomenium acutum* Rehder et Wilson)为防己科植物，有镇痛消炎作用。市售商品常称青风藤，它并非清藤科(Sabiaceae)，但常以讹传讹沿用下来。它的根茎所含主要成分是防己碱(sinomenine，曾称青藤碱，**82**)与清风藤碱(sinoacutine，**83**)。防己碱 $C_{19}H_{23}O_4N$，为酚性生物碱，熔点161℃，$[\alpha]_D$ 为 -70°(乙醇)；

紫外光谱显示四氢异喹啉吸收 263nm (lgε3.79);红外光谱显示苯酚吸收 3575 cm^{-1}、1590 cm^{-1}、1296 cm^{-1} 及α,β-不饱和酮吸收 1700 cm^{-1};^{1}H-NMR($CDCl_3$)显示—NCH_3 δ2.34ppm(3H, s)、—OCH_3 δ3.40ppm(3H, s)、$ArOCH_3$ δ3.70ppm(3H, s)、AB芳香质子 δ6.56ppm 和 δ6.44ppm(各1H, d, J = 7 Hz)、烯质子 δ5.40ppm(1H, s)及酮基邻位 CH_2 δ2.30ppm 和 δ2.40ppm(各 1H, d, J = 14)。

82 **83**

清风藤碱(**83**),熔点 198℃,$[\alpha]_D$ 为 −81.6℃(氯仿),$C_{19}H_{21}O_4N$,比防已碱少两个氢。它的结构是早期通过 UV 与化学反应加以确定的。它的展开式为 $C_{15}H_{11}(OCH_3)_2(OH)(>CO)(NCH_3)$;紫外光谱吸收 ν_{max} (lgε) 为 242nm (4.32,)、281nm(3.82),表明它比防已碱多一个双键,二者除同样具有四氢异喹啉基团外,另一对双键共轭体系与防已碱不同;红外光谱 ν_{max} 显示含酚羟基(3525cm^{-1}、1296cm^{-1})、不饱和羰基(1882cm^{-1})与共轭双键(1646cm^{-1}、1626cm^{-1})。它用 KBH_4 还原成醇 **84**,这时紫外光谱吸收 λ_{max} (lgε) 为 242nm (4.32),表明 **83** 的两个双键都与羰基共轭,还原后失去这种共轭,紫外光谱显示四氢异喹啉的吸收峰,这种αβ-α′β′-共轭酮的排列只能如 **83** 所示,但还不能确定甲氧基的位置。当 **84** 经酸处理,去水而成(−)-蒂巴因(*l*-thebaine,**85**),从而确定了清风藤碱中另一个甲氧基的位置[36]。

83 → KBH_4 → **84** → H^+ → **85**

四、吡啶酮类生物碱——石杉碱

1. 石杉碱甲和石杉碱乙

从浙江产的石松属(*Lycopodiaceae*)植物蛇足石杉[*Huperzia serrata*

(Thunb) Trev.]中分离得到了以石杉碱甲为代表的一系列吡啶酮(pyridone)类乙酰胆碱酯酶抑制剂生物碱[37,38]。石杉碱甲(huperzine A, **86**)分子式为 $C_{15}H_{18}ON_2$,熔点 230℃,$[\alpha]_D$ 为 −150.4°(c 0.5, MeOH);紫外光谱最大吸收 λ_{max}(lgε)为 231nm(4.0)、313nm(3.89);红外光谱 ν_{max} 为 3180cm^{-1}、1650cm^{-1}、1550cm^{-1};^{1}H-NMR显示分子中含吡啶酮母核结构。其结构的最后推定由核磁共振波谱数据比较及 NOE 差谱分析得到。石杉碱乙(huperzine B, **87**)分子式为 $C_{16}H_{20}ON_2$,熔点 270~271℃,$[\alpha]_D$ 为 −54.2°(c 0.2, MeOH);紫外光谱最大吸收 λ_{max}(lgε)为 231nm(3.95)、312nm(3.85);红外光谱吸收 ν_{max} 为 3100cm^{-1}、1670cm^{-1}、1620cm^{-1}、1610cm^{-1}、1560cm^{-1}。石杉碱乙的 C-12、C-13 位形成了另一个哌啶环。两个生物碱的 NMR 数据见表 4-5。

86　　　　**87**

表 4-5　石杉碱甲和石杉碱乙的 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 数据

编号	^{1}H-NMR				^{13}C-NMR δ/ppm	
	86 (100 MHz)		**87** (400 MHz)		**86**	**87**
	δ/ppm	J/Hz	δ/ppm	J/Hz	(22.63MHz)	(25.18MHz)
1					165.52 (s)	165.39 (s)
2	6.38, d	9	6.43, d	9	116.97 (d)	117.90 (d)
3	7.84, d	9	7.68, d	9	140.25 (d)	140.37 (d)
4					122.95 (s)	117.90 (s)
5					142.59 (s)	143.27 (s)
6	2.72, 2H	16, 3, 0	α, 2.85, dd; β, 2.43, d	18, 5; 18, 0	35.24 (t)	29.45 (t)
7	3.56, m		2.34, ddd	4, 5, 5	32.95 (d)	34.59 (d)
8	5.38, d	5	5.43, bd	5	124.36 (d)	126.12 (d)
9			α, 2.29, ddd; β, 2.74, ddd	14, 13, 2; 14, 3, 2		48.03 (t)
10	1.62, d, 3H	7	α, 1.54$^{1)}$; β, 1.43, ddddd	13,13,13,3,3	12.31 (q)	25.34$^{2)}$ (t)
11	5.46, q	7	α, 1.22, dddd; β, 1.54$^{1)}$	4, 13, 13, 13	111.23 (d)	28.13$^{2)}$ (t)
12			1.67, ddd	13, 4, 4	143.30 (s)	40.70 (d)
13					54.35 (s)	53.22 (s)

续表

编号	^{1}H-NMR				^{13}C-NMR δ/ppm	
	86 (100 MHz)		**87** (400 MHz)		**86**	**87**
	δ/ppm	J/Hz	δ/ppm	J/Hz	(22.63 MHz)	(25.18 MHz)
14	2.12, s, 2H		H_{endo}, 1.83, d H_{exo}, 2.02, d	17 17	49.25 (t)	41.67 (t)
15					134.09 (s)	132.23 (s)
16	1.46, s, 3H		1.59, s, 3H		22.57 (q)	22.68 (q)
NH (吡啶酮环上)	13.20, bs		13.20, bs			

注：$CDCl_3$ 中测定，TMS 为内标物。

1) 表示重叠信号。

2) 表示可交换。

2. 石杉碱甲的全合成

由于石杉碱甲的显著生理活性，目前已有一些该化合物的全合成报道[39]。Kozikovski[40]从单保护的环己二酮(**88**)开始，通过关键中间体β-烯醇酯(**89**)，以较短的合成路线完成了石杉碱甲的全合成。目前石杉碱甲立体选择性合成的对映体过剩值已达到90%[41]。石杉碱的结构改造较成功的是其席夫碱衍生物希普林(shiprine, **90**)，疗效比石杉碱甲高[42]。

PhSH, AIBN　20% NaOH / THF, MeOH　$(PhO)_2P(O)N_3/Et_3N$ / MeOH　TMSI, NaOH / TfOH

86

$SOCl_2$　**86** / △, EtOH

90

3. 石杉碱的生理活性

石杉碱甲是迄今为止天然产物中发现的最强效的乙酰胆碱酯酶抑制剂，动物及临床试验都显示有促智及改善多种实验性记忆障碍的作用，同时药理试验证实其具有保护神经细胞对抗β–淀粉样蛋白产生的毒性及其诱导的细胞凋亡作用，对于促智、改善记忆和老年人行为能力方面均有疗效。石杉碱甲片剂在1996年获得了我国西药新药证书，石杉碱甲胶囊等其他剂型正在进行申请临床研究，是具有很大潜力的治疗阿尔茨海默病的天然药物。

表4–6显示了体外酶活性抑制模型中，石杉碱甲(**86**)比目前国际市场上治疗阿尔茨海默病的两个新药它克林(tacrine)和多奈派齐(donepezil)在乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制与产生外周神经系统毒副作用的丁酰胆碱酯酶(BuChE)抑制方面都显示了更高的选择性。石杉碱甲的乙酰胆碱酯酶抑制作用也大大高于石杉碱乙。对石杉碱甲进行结构改造得到的石杉碱甲Shiff碱衍生物希普林(ZT–1, **90**)对胆碱酯酶抑制的选择性更高。

表 4-6 石杉碱甲及其他胆碱酯酶抑制剂选择性作用比较

药物	抑制酶活力 50% 所需浓度/(nmol/L)		IC_{50} 比率 (AChE)
	丁酰胆碱酯酶 (BuChE) (大鼠血清)	乙酰胆碱酯酶 (AChE) (大鼠大脑皮层匀浆)	
希普林 ZT-1 (**90**)	116 333. 3± 6984. 1	63. 6 ± 0. 5	1829
石杉碱甲 (**86**)	54 500. 0 ± 838. 6	56. 2 ± 2. 6	970
多奈派齐 (donepezil)	7663. 3 ± 346. 4	13. 8 ± 0. 7	555
它克林(tacrine)	58. 0 ± 1. 2	82. 4 ± 3. 5	0. 7

参 考 书 目

[1] 徐任生, 叶阳, 赵维民. 天然产物化学(第二版). 北京:科学出版社, 2004
[2] 林启寿. 中草药成分化学. 北京:科学出版社, 1977
[3] 徐任生, 陈仲良. 中草药有效成分的提取和分离 (第二版). 上海:上海科技出版社, 1983
[4] Manske R H F, Brossi A, Cordell G A. The Alkaloids. New York: Academic Press, 1950~ 2001
[5] Pelletier S W. Alkaloids(Chemical & Biological Perspectives). New York:John Wiley & Sons, now Pergamon, 1983~ 2001
[6] 姚新生. 天然药物化学, 北京:人民卫生出版社, 2001
[7] 霍斯泰特曼 K, 马斯顿 A, 霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术. 赵维民等译. 北京:科学出版社, 2000

参 考 文 献

[1] Boit N G. Ergebnisse der Alkaloid-Chemie. Berlin: Akademie Verlag, 1961, 574
[2] Schild et al. Ber Dtsch Chem Ges, 1936, 69:74
[3] Gö tz M et al. Tetrahedron Letters, 1961, 20:707
[4] Gö tz M et al. Tetrahedron, 1968, 24:2631
[5] Edwards O E. Can J Chem, 1962, 40:455
[6] 朱任宏等. 化学学报, 1955, 21:173
[7] 郭伽等. 化学学报, 1981, 36(4):865
[8] Dongliang Cheng et al. Journal of Natural Products, 1988, 51(2):202
[9] Xu R S et al. Tetrahedron, 1982, 38:2667
[10] 徐任生等. 化学通报, 1985, 12:1
[11] 徐任生等. 结构化学, 1986, 5:97
[12] 林文翰等. 化学学报, 1990, 48:811
[13] 林文翰等. 化学学报, 1991, 49:927
[14] 林文翰等. 化学学报, 1991, 49:1034
[15] 林文翰等. 有机化学, 1991, 11:500

[16] Lin W H et al. Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research, 1991, 21(2):189
[17] Lin W H et al. Chin Chem Lett, 1991, 2:369
[18] Lin W H et al. J Nat Prod, 1992, 55(5):571
[19] Lin W H et al. Phytochemistry, 1994, 36(5):1333
[20] Yang Ye et al. Chin Chem Lett, 1992, 3(7):511
[21] Yang Ye et al. J Nat Prod, 1994, 57:665
[22] Yang Ye et al. Phytochemistry, 1994, 37(4):1201
[23] Yang Ye et al. Phytochemistry, 1994, 37(4):1205
[24] Qin G W et al, Med Res Rev, 1998, 18:375
[25] Xu R S. Studies in Natural Products Chemistry, Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sciences B V, 1989, 21:729
[26] Pilli R A et al. Nat Prod Rep, 2000, 17:117
[27] Sakata K et al. Agri Bio Chem, 1978, 42:457
[28] 林文翰等. 有机化学, 1991, 11:500
[29] Wall M E et al. J Am Chem Soc, 1966, 88:3888
[30] 徐任生等. 化学学报, 1977, 35:194
[31] 上海药物研究所. 中华医学杂志, 1978, 58:598
[32] 朱关平等. 科学通报, 1978, 23:761
[33] Kinsbury W D et al. J Med Chem, 1991, 34:98
[34] Sawada S et al. chemy Pharm Bull, 1991, 39:1446
[35] Stehlin et al. Int J Oncol, 1999, 14:821
[36] Xu R S et al. Scientia Sinica, 1964, 13:2016
[37] Liu J S et al. Can J Chem, 1986, 64:837
[38] Ayer W A et al. Can J Chem, 1989, 67:1538
[39] Bai D L. Pure & Applied Chemistry, 1993, 61:1103
[40] Kozikowski A et al. J Org Chem, 1991, 56:4637
[41] He X C et al. Tetrahedron:Asymmetry, 2001, 12(23):3213
[42] 朱大元等. 国际专利, WO96/20176, 1

第五章　单　　萜

根据异戊二烯规则(isoprene rule),其中以两个异戊二烯构成的称为单萜,单萜化合物存在于挥发油类(volatile oil),挥发油又称精油(essential oil),是一类具有挥发性可随水蒸气蒸馏出来的油状液体,大都具有香气。含挥发油的中草药非常多,也多具芳香气,尤以唇形科(薄荷、紫苏、藿香等)、伞形科(茴香、当归、芫荽、白芷、川芎等)、菊科(艾叶、茵陈蒿、苍术、白术、木香等)、芸香科(橙、橘、花椒等)、樟科(樟、肉桂等)、姜科(生姜、姜黄、郁金等)等更为丰富。

单萜化合物在医药工业、香料工业、昆虫信息素及昆虫驱避剂等方面都有广泛的用途。有关单萜的专著和综述[1~6]已有很多。

第一节　单萜化合物的提取与分离

一、挥发油的一般性质

(一) 挥发油的化学组成

挥发油在植物界分布很广,我国野生与栽培的芳香药用植物有数百种之多。挥发油为多种类型化合物的混合物,由十几种到100多种成分组成,其中有脂肪族化合物、芳香族化合物,更多为萜类衍生物。

1. 脂肪族化合物

脂肪族化合物有烃、醇、醛、酮、酯等,广泛存在于植物特别是水果中,如正丙醇、辛醛、乙酸乙酯、甲酸、辛酸的乙酯等。

2. 萜类化合物

挥发油中的萜类主要为单萜与倍半萜,可以含氧或不含氧。对于大多数挥发油来说,不含氧的烃类成分虽占大量,但多数无合适香气因而不是重要成分,如α-蒎烯、β-蒎烯、樟烯、月桂烯等;含氧衍生物有醇、醛、酮、醚、酸、酚、酯等,含量虽较少但大多具有优异芳香气,是挥发油中的重要成分,如芳樟醇、香茅醇、薄荷醇、香茅醛、柠檬醛、1,8-桉树脑等。

3. 芳香化合物

挥发油中的芳香化合物,除一般的芳香含氧衍生物如苯乙醇,水杨酸、水杨酸

甲酯等以外,有的是萜类衍生物,如对聚伞花素(*p*-cymene)、百里香酚(thymol)等。除此之外,大多数为苯丙素的衍生物。

(二) 挥发油的通性

1) 大多数挥发油无色或淡黄色。均具特殊气味(多为香气)与辛辣味,一般在室温下可挥发。

2) 极大多数挥发油比水轻,仅少数挥发油比水重,如丁香油、桂皮油等,相对密度一般在 0.850~ 1.180 之间。

3) 挥发油难溶于水,能完全溶解于无水乙醇、乙醚、氯仿、脂肪油中。在不同浓度的含水乙醇中可溶解一定量,乙醇浓度越小,挥发油溶解的量也越少。挥发油在水中能溶解少量而使水溶液具有该挥发油特有的香气,医药上常利用这一性质来制备芳香水与注射剂,如薄荷水、鱼腥草注射液、柴胡注射液等。

4) 各种挥发油均具一定的旋光性与折光率,一般挥发油的折光率都在 1.450~ 1.560 之间。

5) 挥发油是由多种化学成分组成的混合物,故多数无确定的沸点与凝固点。

6) 在低温时,挥发油中常可有固体物质(为油的组成之一)析出,如薄荷油中析出薄荷醇、桂皮油中析出桂皮醛、樟油中析出樟脑等。

二、单萜化合物的提取

绝大多数的单萜化合物均存在于挥发油之中,挥发油的提取方法可分为如下几种:

(一) 蒸馏法

蒸馏法是从中药材中提取挥发油最常用的方法。将原料粉碎后,放入水中浸泡,然后采用直接蒸馏或水蒸气蒸馏法将挥发油蒸馏出。前者是将中药与水共煮沸时,挥发油随蒸气一并馏出。此法虽简单,但受热温度较高,有可能使挥发油的某些成分发生分解,同时因过热还可能使中药焦化,影响挥发油质量;水蒸气蒸馏法是将中药预先加水浸泡,然后通入水蒸气,使挥发油随导入的蒸气一并馏出。此法由于中药材未直接与加热器接触,可避免过热或焦化,但设备要复杂一些。

上述方法得到的蒸出液均因油水共存,形成乳浊液。所以常采用盐析法促使挥发油从水中分出。然后用分液漏斗或用低沸点有机溶剂萃取获得挥发油。

(二) 溶剂提取法

提取挥发油只能用石油醚或乙醚等低沸点溶剂,室温冷浸或连续回流浸出,蒸去溶剂即得精油。这个方法具有得率高的优点,不会像水蒸气蒸馏那样,某些精油

在提取过程中分解变质或水溶性成分不容易分离得到。

近年来,以二氧化碳为提取溶剂的方法越来越引起人们的兴趣,整个提取过程被称为二氧化碳超临界提取(super-critical carbon dioxide extraction),而实际上所采用的压力往往低于临界压力,提取介质处于亚临界状态。由于所采用的压力需使二氧化碳在常温下液化,所用设备价格昂贵,提取成本较高。此方法的最大优点是二氧化碳很容易除去,无需考虑溶剂残留。

(三) 压榨法

压榨法或称冷压法是三种提取方法中最简单的一种,是通过物理挤压的方法来得到精油,用该法获得的精油又称压榨油。该方法适用于含挥发油量较高的材料,如鲜橘皮、柠檬皮等。

在香料工业生产上,还有其他提取精油的方法,如吸收法,像茉莉、晚香玉等花极不耐热,可将花洒在涂有脂肪的板上,让精油吸入脂肪,然后再从脂肪中提取精油。此外,还有脂肪温浸等方法。

三、挥发油成分的分离纯化方法

经蒸馏法、溶剂法或压榨法得到的挥发油都是混合物,要想得到单一的成分必须进一步分离纯化。目前常用的分离法有分馏法、化学分离法和层析法。实际工作中往往几种方法配合使用才能达到分离目的。

(一) 分馏法

挥发油中由于成分类别不同,沸点差异较大。组成萜类成分的各族碳原子一般相差 5 个,加上双键数目和含氧官能团的不同,各成分之间的沸点有一定差距,对于各萜类成分的沸点差异有一定规律性。在单萜中,沸点随着双键的减少而降低,三烯 >二烯 >一烯;含氧单萜中,沸点随官能团极性的增加而升高,醚 <酮 <醛 <醇 <酸。由于相对分子质量增大,酯的沸点比相应醇的沸点高。挥发油中某些成分在沸点温度下往往被破坏,通常采用减压分馏法进行分离。对于未知成分则要预先测试沸程再进行分馏。

(二) 化学分离法

化学分离法是根据挥发油中各组分的结构或官能团不同,采用化学方法处理,使各组分得到分离的方法。

1. 碱性成分的分离

分离挥发油中的碱性成分时可将挥发油溶入乙醚中,加 1% 盐酸或硫酸萃取,

分取酸水层后经碱化再用乙醚萃取,蒸去乙醚即得碱性成分。

2. 酸、酚性物质的分离

分离挥发油中酸性成分时,可先用5%碳酸氢钠直接进行萃取,酸性成分形成钠盐而溶于碱水层中,分出碱液后加稀酸酸化,再用乙醚振摇萃取,蒸去乙醚,可分离得到酸性成分。

除去酸性物质后的挥发油,再以2%氢氧化钠或氢氧化钾萃取,碱溶液酸化后,用乙醚萃取,蒸去乙醚成分分离得到酚性物质或其他弱酸性成分。

3. 羰基化合物的分离

挥发油中的醛、酮类化合物与多数羰基试剂形成加成物,如缩氨脲、肟、苯腙、Girard腙、亚硫酸氢钠加成物等,进行分离最常用的是亚硫酸氢钠和Girard试剂,使亲脂性的羰基化合物转变为亲水性的加成物而加以分离。但亚硫酸氢钠只能与醛和部分酮形成加成物,而Girard试剂则对所有的羰基化合物都适用。

(1) 亚硫酸氢钠分离法

在提出酸性成分后的挥发油乙醚溶液中加入30%的亚硫酸氢钠溶液,在低温下短时间振摇提取,即有结晶加成物析出或生成的加成物溶于水,与其他精油分开。分离后再加酸或碱溶液处理进行分解,即获得原来的羰基化合物。此法应注意操作条件,提取时间过长或温度过高,有使亚硫酸氢钠加成到双键的可能,形成不可逆的双键加成物。其反应为

$$RHC{=}O + NaHSO_3 \longrightarrow R{-}\overset{H}{C}(SO_2Na)(OH)$$

(2) Girard试剂分离法

Girard试剂是分子内带有酰肼(hydrazide)及季铵基团试剂的总称,常用的有Girard试剂T和Girard试剂P,能与羰基反应,生成Girard腙。去除酸、酚性成分的挥发油中性母液,加入Girard试剂的乙醇液和10%的乙酸促进反应进行,加热回流1h后,生成水溶性衍生物,使含羰基化合物转溶于水层,加水稀释,再以乙醚除去不含羰基的精油后,分出水层加酸(如盐酸)酸化,再用乙醚提取,蒸去乙醚后复得羰基化合物。

4. 醇的分离

常用的方法是以过量的邻苯二甲酸酐和丙二酸酰氯等试剂反应生成相应的酸性酯转溶于碳酸钠溶液中,乙醚提取多次后的碳酸钠溶液用浓盐酸酸化,以乙醚提取单酯,蒸去乙醚,残留物经皂化,以乙醚萃取,回收原来的醇类化合物。伯醇容易

形成酯,仲醇反应较慢,叔醇则较难反应。

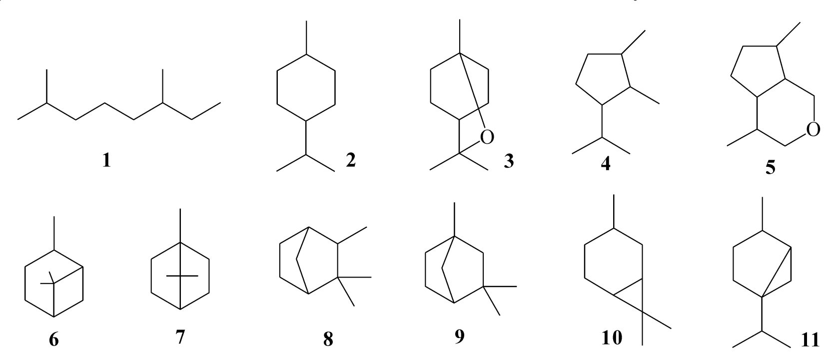
上述挥发油成分纯化方法中的有些操作过程需要酸、碱处理,因此对酸、碱敏感的化合物不能应用。挥发油经初步纯化后,往往采用重结晶、真空精馏、氧化铝或硅胶层析等方法,能将其中大部分成分提纯。

第二节　单萜化合物的分类与分析方法

一、单萜化合物的基本类型

单萜化合物是由甲瓦龙酸(mevalonic acid)经磷酸化,再经脱羧及脱水生成异戊烯基二磷酸酯(isopentenyl diphosphate, IPP),IPP 并进一步异构化为二甲基烯丙基二磷酸酯(dimethylallyl diphosphate,DMAPP),IPP 和 DMAPP 通过反式 1,2-加成和反式 1,2-消除,以“头-尾”形式相连构成牻牛儿基二磷酸酯(geranyl diphosphate, GPP),再经生物体内转化形成如下各种单萜化合物基本母核。

无环单萜类:2,6-二甲基辛烷型(2,6-dimethyloctane,**1**)。单环单萜类:薄荷烷型(menthane,**2**),桉树脑型(cineole,**3**),虹彩烷(iridane,**4**),环烯醚萜(iridoid,**5**)。双环单萜类:蒎烷型(pinane,**6**),樟烷型(camphane,**7**)及异樟烷型(isocamphane,**8**),葑烷型(fenchane,**9**),蒈烷型(carane,**10**),苧烷(thujane,**11**)等。



仍有很多天然单萜化合物尽管是从异戊二烯 C_5 单元衍生而来,却不符合首尾相连的异戊二烯规则,这类化合物被归入不规则单萜化合物(irregular monoterpene)。

二、精油的成分分析与含量测定

从事中草药的精油成分研究之前,往往要测定其在该植物中的含量;主要原理是用中草药中所含挥发油能随水蒸气共同蒸馏出来收集在标准测定器中计算其含量。常用的方法与仪器在中国药典中均有规定。

色谱分离方法是精油质量控制(QC)及其成分分析的常用手段。香料和精油工业是应用气相色谱(GC)技术的先驱领域,至今色谱技术仍是这个领域中分析化学家的“右臂”。气相色谱-质谱法(GC-MS)是越来越普遍采用的分析技术,高分辨毛细管 GC、保留指数和与计算机资料数据相匹配的质谱图的联用,在精油化学及许多其他有机分析领域已成为广泛采用的鉴定标准。

此外,1979 年报道过第一次成功地应用高分辨 GC 柱于 GC-FTIR 进行香料分析[7]。有人发展了红外光谱图书馆检索程序[8];关于 GC-MS、GC-FTIR 的分析方法已有人进行了综述[9]。

三、单萜化合物的结构鉴定

单萜类化合物的结构主要通过现代光谱解析来确定,其中核磁共振波谱和质谱技术能够提供最为详尽的结构信息。单萜质谱数据及其裂解规律已有详尽的文献归纳[10]。^{1}H-NMR[11]和^{13}C-NMR[12,13]技术也有综述。

第三节　无环单萜化合物

具有 2,6-二甲基辛烷型的单萜化合物中,最重要的是牻牛儿醇(geraniol,**12**)、橙花醇(nerol,**13**)、芳樟醇(linalool,**14**)、香茅醇(citronellol,**15**)、香茅醛(citronellal,**16**)、柠檬醛(citral,*Z* 式 **17**,*E* 式 **18**)等萜醇类化合物,为香料工业中最主要的单萜类成分。此外,还有β-月桂烯(myrcene,**19**)等萜烯类成分。

OH　OH　OH　OH　O　O　O

12　**13**　**14**　**15**　**16**　**17**　**18**　**19**

第四节　单环单萜化合物

薄荷醇(menthol, **20**)又称薄荷脑(mentha-camphor),是最重要的环状单萜醇,为薄荷 *Mentha arvensis* 的主要成分。

一、薄荷醇

由于薄荷醇分子中存在着 3 个不对称碳原子,所以它能够产生 4 对不同的立体异构外消旋体,如下所示:

20a(1*S*,2*R*,5*S***)** **20b(**1*R*,2*S*,5*R***)** **20c(**1*S*,2*S*,5*R***)** **20d(**1*R*,2*R*,5*S***)**

20e(1*S*,2*R*,5*R***)** **20f(**1*R*,2*S*,5*S***)** **20g(**1*R*,2*R*,5*R***)** **20h(**1*S*,2*S*,5*S***)**

除了(－)–薄荷醇和(＋)–新薄荷醇存在于天然薄荷油中,其他异构体都是由化学合成制备。

二、(±)–薄荷醇的类似物

其他薄荷醇类似物还有(－)–柠檬烯(limonene,**21**)、(－)–反式香芹醇(*trans*–carveol,**22**)、(－)–香芹酮(carvone,**23**)、(－)–反式异薄荷二烯醇(*trans*–isopiperitenol,**24**)、(－)–异薄荷二烯酮(isopiperitenone,**25**)、薄荷二烯酮(piperitenone,**26**)、布枯脑(diosphenol,**27**)、对聚伞花素(*p*–cymene,**28**)、百里香酚(thymol,**29**)及香芹酚(carvacrol,**30**)等。其中香芹酚(**30**)和百里香酚(**29**)具有抗阳性及阴性革兰氏菌作用[14]。

21 **22** **23** **24** **25**

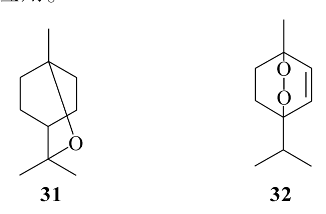
26 **27** **28** **29** **30**

三、桉树脑及其类似物

桉树脑型单萜是由松油醇通过环氧化、脱水而形成的[15],最常见的是 1,8–桉树脑(1,8–cineol, **31**),又称桉油精,是桉叶油的主要成分,也存在于其他一些挥发

油中。其沸点为 176~ 177℃,常作香料和防腐剂。

另外,还有驱蛔素(ascaridole,**32**),存在于土荆芥的挥发油中,故又称为土荆芥油精,因系过氧化物,加热至 130~ 150℃时可发生爆炸并分解。它具有较强的驱蛔能力,并已在实际中应用。



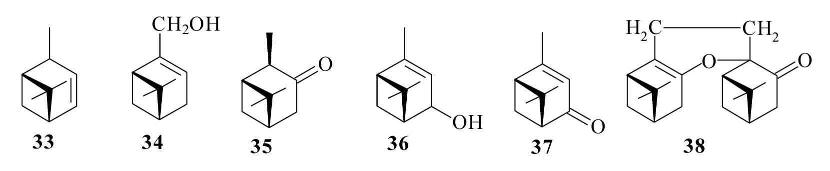
第五节　双环单萜化合物

一、蒎烷型化合物

国产松节油(turpentine)主要得自马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)、云南松(*P. yunnanensis* Fr.)、红松(*P. koraiensis* Set Z.)和华山松(*P. armandii*),尤以马尾松为主要来源,主要成分为 α-蒎烯(α-pinene)、β-蒎烯(β-pinene)及 δ-蒎烯(δ-pinene,**33**),均属蒎烷类衍生物。α-蒎烯为重要的工业原料。

Myrtus communis L.花和叶中的桃金娘烯醇(myrtenol,**34**)、*Hyssopus officinalis* 等挥发油中的松樟酮(pinocamphor,**35**)以及马鞭草油(verbena oil)中的马鞭草烯醇(verbenol,**36**)、马鞭草烯酮(verbenone,**37**)等均属此类型。土荆芥(*Chenopodium ambrosioides* L.)挥发油中的土荆芥酮(aritasone,**38**)[16,17],可以认为是蒎烷的二聚体衍生物。

芍药苷(paeoniflorin,**39**)是毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia albiflora* 根中的蒎烷单萜苦味苷[18],通常以苯甲酸酯形式存在。另外,还有白芍药苷(albiflorin,**40**)、氧化芍药苷(oxypaeoniflorin,**41**)、苯甲酰芍药苷(benzoylpaeoniflorin,**42**)等类似物,多具有镇静、镇痛、抗炎活性。从白芍(*Paeonia lactiflora* Pall)的根中可分离得到芍药新苷[19~21](lactiflorin,**43**)。



R_1=H R_2=H **39**
R_1=OH R_2=H **40**
R_1=H R_2=C_6H_5CO **41**

42

43

芍药苷(**39**)为白色无定形粉末,$[\alpha]_D^{16}$ 为 – 12.8°(*c*, 4.6, MeOH),遇硫酸显紫褐色,紫外光谱中在 230nm 处苯甲酰基特征吸收,碳谱和氢谱数据归纳如下[22,23]。

^{1}H–NMR δ(ppm):1.81(1H, d, *J*=12.5Hz, 3α–H),2.19(1H, d, *J*=12.5Hz, 3β–H),2.56(1H, d, *J*=6.5Hz, 5–H),1.95(1H, d, *J*=10.8Hz, 7α–H),2.49(1H, m, *J*=10.8Hz, 6.5Hz, 7β–H),4.74(2H, s, 8–H),5.42(1H, s, 9–H),1.36(3H, s, 10–H),4.50(1H, d, *J*=7.5Hz, 1′–H),3.20(1H, m, 2′–H),3.25(1H, m, 3′–H),3.23(1H, m, 4′–H),3.23(1H, m, 5′–H),3.61(1H, brd, *J*=7.5Hz, 6′–H),3.84(1H, d, *J*=11.7Hz, 6′–H),8.04(2H, d, *J*=7.5Hz,2″,6″–H),7.47(2H, d, *J*=7.5Hz, 3″,5″–H),7.60(1H, m, *J*=7.5Hz, 5″–H)。

^{13}C–NMR δ(ppm):87.3(s, C–1),85.2(d, C–2),42.5(t, C–3),104.4(s, C–4),41.9(d, C–5),70.2(s, C–6),21.4(t, C–7),59.7(t, C–8),100.2(d, C–9),17.6(q, C–10),98.1(d, C–1′),72.9(d, C–2′),75.9(d, C–3′),69.7(d, C–4′),75.9(d, C–5′),60.8(t, C–6′),129.1(s, C–1″),128.6(d, C–2″,C–6″),127.6(d, C–3″,C–5″),132.4(d, C–4″),166.0(s, C–7″)。

二、樟烷及异樟烷型衍生物

樟烷一般以含氧衍生物的形式存在于植物界,如樟脑(camphor,**44**)、龙脑(borneol,**45**)和异龙脑(isoborneol,**46**)等。樟脑是重要的医药和工业原料,主要存在于樟树的挥发油中,我国的天然樟脑产量占世界第一位。樟脑在医药上主要作为刺激剂和强心剂,其强心作用是由于在人体内被氧化成π–氧化樟脑(*trans*–π–oxocamphor, **47**)和对氧化樟脑(*p*–oxocamphor, **48**)而导致的。

44 **45** **46** **47** **48** **49**

三、葑烷、蒈烷及苧烷型衍生物

葑烷(fenchane)又称小茴香烷;葑酮又称小茴香酮(fenchone,**50**),均存在于小茴香和侧柏的挥发油中;葑醇(fenchol,**51**)又称小茴香醇。

蒈烷型(carane)化合物,如 2-长松针烯(2-carene,**52**)、3-长松针烯(3-carene,**53**)、β-长松针烯(β-carene,**54**)和长松针酮(carone,**55**)等。

苧烷(thujane)又称侧柏烷。侧柏烯由于分子中双键位置不同而有多种异构体,如α-侧柏烯(α-thujene,**56**)和β-侧柏烯(β-thujene,**57**)存在于侧柏枝叶的挥发油中;油冬青烯[(+)-sabinene,**58**]存在于桧油中;侧柏醇(thujanol,**59**)存在于艾蒿和滨蒿的挥发油中,是各立体异构体的混合物。侧柏酮与侧柏醇常共存于一挥发油中,侧柏酮也有多种立体异构体,其中重要的有两种:α-侧柏酮[(-)-thujanone,**60**];β-侧柏酮或称异侧柏酮[(+)-thujanone,**61**]。前者是侧柏叶挥发油的主要成分,后者为艾菊油的主要成分。

50　**51**　**52**　**53**　**54**　**55**

56　**57**　**58**　**59**　**60**　**61**

四、环烯醚萜及其苷类

环烯醚萜(iridoid)是指植物界中虹彩二醛(iridodial)通过分子内羟醛缩合形成的一类化合物,其结构特征是具有环戊烷吡喃环系统,分子内一般带有环烯醚键。环烯醚萜 4-位上的甲基可经生物氧化形成羧基,然后再发生脱羧反应形成降解产物 4-去甲基环烯醚萜;若在环烯醚萜醇分子中环戊烷部分 C-7、C-8 发生开环,即得到裂环环烯醚萜(seco-iridoid)。环烯醚萜及其苷类在植物界中分布较广,多以苷的形式存在,尤以玄参科、茜草科、唇形科、鹿蹄草科、水晶兰科、龙胆科和木犀科等植物分布最为普遍。

环烯醚萜苷类多为白色结晶体,味苦。苷类易被水解,苷元由于具有缩醛结构,化学性质活泼,容易进一步分解或聚合,不容易得到结晶。苷元遇酸、碱、羰基

化合物和氨基酸等都能变色。此类成分多能产生吡喃衍生物的特征颜色反应,如 Shear 试剂[浓盐酸与苯胺(1∶15)的混合溶液]与车叶草苷反应,产生黄色然后变为棕色,最后转为深绿色。中药玄参、地黄等炮制后变黑,就是这类成分起的作用。

(一) 环烯醚萜及其苷类

环烯醚萜类的一般结构特点是 4-、8-位多为甲基,1-位多数存在取代基,可能为羟基、甲氧基或酮基。3-、4-位大多有双键,构成典型的环烯醚结构,这一结构类型的衍生物数目最多,如虹彩二醛(iridodial,**62**)、道蚁二醛(dolichodial,**63**)、伊蚁内酯(iridomyrmecin,**64**)、异伊蚁内酯(isoiridomyrmecin,**65**)、新木天蓼醇(neomatatabiol,**66**)、京尼平(genipin,**67**)等。

CHO CHO **62**　CHO CHO **63**　11 4 6 5 O 3 7 8 O 9 10 1 **64**

O O **65**　O OH **66**　$COOCH_3$ O $HOCH_2$ OH **67**

植物界目前发现的主要是环烯醚萜葡萄糖苷和 4-去甲基环烯醚萜苷,常常是 1-位上羟基与糖缩合成苷,且以单糖苷最为普遍。这类环烯醚萜苷常见的有环戊烷型、环戊烯型和 7,8-环氧型等。

4-位有取代基的环烯醚萜苷存在于栀子、鸡矢藤、马钱子、金银花、肉苁蓉等中草药中,分布较广泛。

鸡矢藤的茎叶用于治疗支气管炎、咳嗽腹胀等疾病,其中的环烯醚萜苷有车叶草苷(asperuloside,**68**)、鸡矢藤苷(paederoside,**69**)、鸡矢藤次苷(scandoside,**70**)、鸡矢藤苷酸(paederosidic acid,**71**)等。

栀子(*Gardenia jasminoides*)用于治疗热病虚烦不眠、黄胆、咽痛及疮疡等疾病。栀子果仁中先后分离出八种环烯醚萜苷,较重要的有栀子苷(geniposide,**72**),又称京尼平苷(geniposide,**72**),有软化大便的作用;其苷元京尼平(genipin,**67**)具有显著的促进胆汁分泌作用。山栀苷(shanzhiside,**73**)和京尼平-1-氧-龙胆双糖(genipin-1-*O*-gentiobioside,**74**)也存在于该植物中。

68 69 70 71

72 73 74

鸡矢藤苷(**69**)为鸡矢藤苷酸(**71**)的γ-内酯,分子中带有两个结晶水。Inouye 等[24,25]仅根据元素分析和转化成其衍生物车叶草苷(**68**),将其结构错误地定为10-位硫代乙酰化产物。Suzuki 等[26]利用核磁共振二维谱技术进行了详尽的NMR 研究,结合质谱、红外光谱分析纠正了其结构。

鸡矢藤苷(**69**),熔点 122~ 123℃,$[\alpha]_D$ 为 − 195°(*c*, 0.41, MeOH)。

UV:λ_{max}(lgε)为 235nm(4.02)。

IR(KBr)ν_{max} 为 1740cm^{-1}、1710cm^{-1}、1655cm^{-1}。

FAB-MS:*m/z* 为 469([M + Na]$^+$)。

^{1}H-NMR δ(ppm):5.94(1H, d, *J* = 2.0Hz, 1-H),7.30(1H, d, *J* = 2.0Hz, 3-H),3.69(1H, ddd, *J* = 6.5, 4.0, 2.0Hz, 5-H),5.56(1H, ddd, *J* = 6.5, 2.5, 1.8Hz, 6-H),5.73(1H, ddd, *J* = 2.5, 1.2, 0.8Hz, 7-H),3.37(1H, m, 9-H),4.83(1H, ddd, *J* = 14.0, 2.5, 1.2Hz, 10-H),4.91(1H, ddd, *J* = 14.0, 2.5, 1.2Hz, 10-H),2.34(3H, s, $\underline{CH_3}$SCO),4.68(1H, d, *J* = 8.0Hz, 1′-H),3.19(1H, dd, *J* = 9.0, 8.0Hz, 2′-H),3.37(1H, dd, *J* = 9.0, 9.0Hz, 3′-H),3.28(1H, dd, *J* = 9.0, 9.0Hz, 4′-H),3.34(1H, ddd, *J* = 9.0, 9.0, 2.2Hz, 5′-H),3.67(1H, d, *J* = 11.7Hz, 6′-H),3.92(1H, dd, *J* = 11.7, 2.2Hz, 6′-H)。

^{13}C-NMR δ(ppm):93.2(d, C-1),150.3(d, C-3),106.1(s, C-4),37.5(d, C-5),86.2(d, C-6),129.5(d, C-7),143.8(s, C-8),45.3(d, C-9),64.3(t, C-10),172.7(s, C-11),13.5(q, S$\underline{CH_3}$),172.5(s, CO),100.0(d, C-1′),74.6(d, C-2′),77.9(d, C-3′),71.5(d, C-4′),78.4(d, C-5′),62.8(t, C-6′)。

4-去甲基环烯醚萜苷分布在地黄、玄参、生地、车前等中草药中,且是其主要成分。例如,玄参中的玄参苷(harpagoside,**75**)和哈帕苷(harpagide,**76**)属环戊烷型;车前草中的桃叶珊瑚苷(aucubin,**77**)属环戊烯型,它是车前草清湿热、利小便

作用的有效成分,有抑制革兰氏阳性和阴性菌的作用;治疗哮喘及胃肠道疾病的中药牡荆,其有效成分为阿格努苷(agnuside,**78**);梓醇(catapol,**79**)属于7,8-环氧型,是中药地黄中降血糖作用的有效成分,并有很好的利尿作用和迟发性缓下功用,与地黄的药效相一致。

(二) 裂环环烯醚萜及其苷类

裂环环烯醚萜化合物在龙胆科(Gentianaceae)植物中发现最多,尤以龙胆属(*Gentiana*)和獐芽牙菜属(*Swertia*)植物中更为普遍存在,龙胆苦味素类可作为其代表,如龙胆苦苷(geniopicroside 或 gentiopicrin,**80**)、獐芽菜苷(sweroside,**81**)、獐芽菜苦苷(swertiamarin,**82**)、苦龙胆苷(amarogentin,**83**)等。

第六节 不规则单萜化合物

有些单萜化合物由于发生分子骨架重排而不符合异戊二烯规则,被归类为不规则单萜化合物(irregular monoterpene),这类化合物主要集中于菊科植物中,如除虫菊酯类、紫罗兰酮类似物、卓酚酮类等。

一、除虫菊酯类化合物

除虫菊酯(pyrethrin,**84** ~ **89**)来源于菊科植物除虫菊 *Pyrethrum cinerariaefolium* 或 *Chrysanthemum cinerariaefolium*(Compositae)干花提取物,除虫菊酯(pyrethrin Ⅰ,Ⅱ)、瓜菊酯(cinerin Ⅰ,Ⅱ)、茉莉菊(jasmolin Ⅰ,Ⅱ)是具有极强活性的 6 个杀虫物质的总称[27]。

除虫菊酯类化合物可经皂化后,得到相应的酸(**90**,**91**)和醇(**92** ~ **94**),再分别进行结构分析。

	R_1	R_2
84	Me	CH═CH$_2$
85	CO_2Me	CH═CH$_2$
86	Me	Me
87	CO_2Me	Me
88	Me	Et
89	CO_2Me	Et

90　**91**　**92**　**93**　**94**

Bramwell 等对天然除虫菊酯的 ^{1}H-NMR 进行了详尽的研究[28],Rugutt 等又进行了 2D-NMR 研究[29]。

二、斑蝥素

斑蝥素(cantharidin,**95**)是芫菁科(地胆科)昆虫斑蝥(*Mylabris sidae*)的成虫和幼虫体内所含的一种单萜类成分,并广泛存在于同属其他昆虫中[30]。1975 年,上海斑蝥协作组肯定了斑蝥素为抗癌有效物质,除对治疗原发性肝癌有明显疗效外,还可以治疗白细胞减少、慢性肝炎和神经性皮炎等。近年来我国对斑蝥素的临床应用研究表明:斑蝥素及其衍生物,如甲基斑蝥胺(*N*-methylcantharidimide,**96**)、羟基斑蝥胺(*N*-hydroxylcantharidimide,**97**)等对治疗原发性肝癌疗效显著,明显优于手术治疗和放疗。

95　**96**　**97**

十分有趣的是,斑蝥素并不源自单萜,原来的单萜生源假设证明是错误的,关

于斑蝥素生物合成的知识,应归功于苏黎世大学的 Schmid 小组的研究[31]。Schlatter 等在喂饲试验中证明斑蝥素不是由两个异戊二烯单元首尾连接而成,他们提出了三个异戊二烯单元参与了斑蝥素的合成,证实金合欢醇(farnesol,**98**)是斑蝥素的生源前体,金合欢醇的 1-、5-、6-、7-和 7′-碳原子在斑蝥素生物合成过程中消除,同时 2-、4-、11′-及 12-碳原子加入。斑蝥素的优势前体是全反式金合欢醇。因此,证明斑蝥素源自于倍半萜。

3 MVA → → (MVA=甲瓦龙酸) **98** → → **95**

斑蝥素(**95**)是具有显著刺激性的化合物,呈斜方形鳞状晶体,熔点 218℃。不溶于冷水,溶于热水,难溶于丙酮、氯仿、乙醚、乙酸乙酯。

1953 年,哈佛大学的 Stork 等[32]立体选择性地全合成了斑蝥素。

参 考 文 献

[1] Templeton W. An Introduction to the Chemistry of Terpenoids and Steroids. London: Butter-worth, 1969

[2] Grayson D H. Nat Prod Rep, 1997, 14:477

[3] Grayson D H. Nat Prod Rep, 1998, 15:439

[4] Grayson D H. Nat Prod Rep, 2000, 17:385

[5] Ccharlwood B V et al. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press, 1991

[6] Mookherjee B D et al. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology (4th ed). New York: John Wiley, 1996

[7] Walradt J P. Annu Meet Practice Chromatogr. Philadelphia: Pennsylvania, 1979

[8] Hanna A et al. J Chromatogr Sci, 1979, 17:435

[9] Buchbauer G et al. Mod Methods Plant Anal, 1997, 19:97

[10] 丛浦珠等. 分析化学手册, 第九分册, 质谱分析. 北京:化学工业出版社, 2000,840, 843, 863

[11] 于德泉等. 分析化学手册, 第七分册, 核磁共振波谱分析. 北京:化学工业出版社, 1999,319

[12] 徐任生. 天然产物化学(第二版). 北京:科学出版社, 2004,166~ 195

[13] Fereira M J P et al. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 1998, 33:153

[14] Sivopoulou A et al. J Agric Food Chem, 1996, 44:1202

[15] Russell G F et al. Science, 1971, 172:1043

[16] Nakajima T. Yakugaku Zasshi, 1962, 82:1278

[17] Carreiras M C et al. Phytochemistry, 1987, 26:3351

[18] Aimi N et al. Tetrahedron, 1969, 25:1825
[19] 郎惠英等. 药学学报, 1983, 18:551
[20] Yu J et al. Phytochemistry, 1990, 29, 3859
[21] Lang H Y et al. Tetrahedron, 1990, 46:3123
[22] 张晓燕等. 沈阳药科大学学报, 2001, 18:30
[23] 张晓燕等. 沈阳药科大学学报, 2001, 18:27
[24] Inouye H et al. Tetrahedron Lett, 1968, 44:683
[25] Inouye H et al. Chem Pharm Bull, 1969, 17:1942
[26] Suzuki S et al. Heterocycles, 1993, 35:895
[27] Metcalf R L. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology(4th ed). New York:John Wiley, 1995
[28] Bramwell A F et al. Tetrahedron, 1968, 25:1727
[29] Inouye H et al. J Agric Food Chem, 1999, 47:3402
[30] 谭娟杰等. 昆虫学报, 1995, 38:324
[31] Schlatter C et al. Experientia, 1968, 24:994
[32] Stork G et al. J Am Chem Soc, 1953, 75:384

第六章　倍半萜类

萜类是天然有机化合物中的一个重要组成部分，是由不同个数的异戊烯首尾相接构成，其中以 3 个异戊烯构成的为倍半萜。倍半萜广泛存在于植物、微生物、海洋生物及某些昆虫中，其中很多具有重要的生物功能和生理活性，特别是倍半萜内酯，具有诸如抗菌、抗肿瘤、抗病毒、细胞毒、免疫抑制、植物毒、昆虫激素、昆虫拒食剂等活性，也有一些具有神经系统活性。近期从植物特别是海洋生物中分离得到一系列特殊结构并含有卤素、S、CN、SCN 的化合物，为倍半萜类又增加了很多化学和生理作用方面的新奇内容。因此，倍半萜类仍是天然产物化学中极为活跃的研究领域之一。很多倍半萜是芳香油高沸点部分的主要成分，对芳香油的香味起着重要作用。从化学角度来看，虽然倍半萜骨架仅有 15 个碳原子，但由于生物体内微妙的代谢过程而生成形形色色基本骨架的化合物，并有复杂的立体结构。其化学及光谱研究于 20 世纪 60~70 年代达到高潮，因而成为植物成分中重要的一类。有关的专著及综述已有很多[1~8]，本章主要介绍有关倍半萜的提取分离、光谱解析、结构测定及近年的进展。

第一节　一般性质与提取分离

倍半萜类的分离工作，主要困难在于它们不像生物碱可以有一个提取总碱的方法，也不像黄酮、生物碱等具有专一的呈色反应或其他定性侦查手段。紫外光谱一般也无特征吸收。倍半萜类的定性检查主要靠薄层层析，采用浓硫酸加热显色或用硫酸香兰素，而且所呈的颜色会因时间及硫酸中的含水量而有差别，但在层析过程中比移值或溶剂部位与化合物的极性和化学性质有密切的关系，对推定其归属烃、醛、酮、醚、酯、醇、酸等具有一定参考价值。

倍半萜往往是芳香油中高沸点部分的主要成分，对芳香油的香味关系很大，一般用水蒸气蒸馏所得的芳香油，经分馏蒸出低沸点的单萜部分，高沸点下脚可用层析分离，往往可得到多种倍半萜化合物。关于倍半萜类结构与香味的关系前人已有综述。

系统分离方法[9]：植物原料经切细后用乙醚抽提，乙醚浸膏溶于甲醇，于 -20℃冷冻以部分除去油、酯、蜡及三萜、甾体类杂质，经初步硅胶柱预分后，以石油醚、石油醚-乙醚（9∶1，3∶1，1∶1），乙醚、乙醚-甲醇（9∶1）依次洗脱。石油醚洗脱部分主要为烃类，包括倍半萜烷烃、烯烃，9∶1 洗脱部分主要为醚（氧

环化合物)、醛、酮,3∶1 部分为醛、酮、酯(内酯)类,1∶1 部分为内酯、羟基化合物;乙醚部分为羟基和多羟基化合物,乙醚-甲醇(9∶1)为多羟基化合物及羧酸类。这些大体的经验规律主要是取决于化合物的极性性质,对多官能团的化合物取决于极性大者。天然甾体、三萜类化合,由于其分子比较大,其酯往往出现于石油醚-乙醚(9∶1)部分,单羟基化合物则出现于 3∶1 部分。各部位再进一步层析,或采用制备性薄层层析分离,一般可根据本方法全面检查各部位,或按兴趣分离其中个别部位。一般 200g 生药能分离检查含量在 0.001% 以上的成分并鉴定 20 多个成分的结构。

倍半萜内酯的分离,一般用乙醇抽提,乙醇浸膏经溶剂分配预处理,即利用倍半萜内酯极性中等、不溶于石油醚也不溶于水的特点进行溶剂分配,常用氯仿-水分配以除去水溶部分,浸膏再用石油醚–10% 含水甲醇分配,甲醇部分供分离用,也有用浸膏或原生药用石油醚脱脂以除去非极性部分。或用丁醇-水分配除去极性物质。经上述分配后再做层析分离,一般硅胶或氧化铝层析分离倍半萜类效果很好,个别结构极为相似,化学性质相近的则需要用 HPLC 分离。目前制备性薄层层析仍是倍半萜分离的常用手段,主要因为方法简便,分离制备 10~100mg 并不困难。分离得到的量足以进行化学结构的确定以及体外生物活性的筛选。高效液相层析的分离效果好,制备性高效液相层析,分离条件掌握得好,可用来分离几十个化学成分,能完成制备性薄层达不到的分离要求,但溶剂消耗量大,费用较大,近年液相层析与仪器分析的结合发展极快。液-质联用(LC–MS)和液相核磁联用(LC–NMR)已进入实用阶段,可以利用 LC–MS 和 LC–NMR 直接从分析结果中,推定样品中各种化学组分,并推定其结构。

【例 6-1】 云木香(*Saussurca lappa*)的倍半萜成分

云木香 250g(粗粉)以乙醚抽提,乙醚浸膏经初步硅胶层析划分,各部位以制备性薄层层析分离,粗分用自制的制备性薄层层析板,最后纯化则用 E.Merck 薄层层析板。各成分经 UV、IR、MS、^{1}H–NMR 鉴定。

A. 石油醚部分分离得到化合物 **1** 180mg。

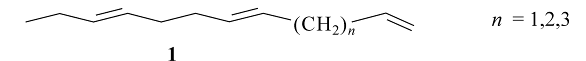
B. 石油醚-乙醚 9∶1 部分,分离得到 **2** 60mg,**3** 24mg 及甾体、三萜酯类。

C. 石油醚-乙醚 3∶1 部分,分离得到 **4** 175mg,**5** 100mg 及甾体、三萜类。

D. 石油醚-乙醚 1∶1 部分,分离得到 **6** 40mg,**7** 和 **8** 的混合物 5mg。

E. 乙醚部分,分离得到 **9** 和 **10** 的混合物 5mg,**11** 14mg,**12** 15mg,**13** 8mg,**14** 6mg。

F. 乙醚-甲醇 9∶1 部分,分离得到 **15** 20mg,**16** 和 **17** 的混合物 8mg。



2　　3　　4　　5

6　　7　　8　　9

10　　11　　12　　13

14　　15　　16　　17

【例 6-2】 圆叶泽兰(*Eupatorium rotundifolium*)的抗肿瘤成分[10]

该工作是以 KB 细胞体外培养指示追踪分离抗白血病的细胞毒有效成分。圆叶泽兰 17kg,乙醇抽提,得抽出物 500g(A)。抽出物以氯仿 4L、水 2L 分配,水部分 150g(B),氯仿部分 283g(C)。氯仿部分以石油醚 3L、含水 10%的甲醇分配,石油醚部分 88g(D),甲醇部分 170g(E)。分别以 KB 细胞培养法做活性试验。ED_{50} (μg/mL):(A)2.6,(B)100,(C)2.1,(D)30,(E)1.9。

取活性最强的 E 部位 70g 以硅胶 3kg 层析,用不同比例的氯仿与甲醇洗脱,分别以 KB 细胞培养检查生物活性,从中分得八种倍半萜内酯。得量与细胞毒活性如表 6-1 所示。

表 6-1 各成分得量与细胞毒活性

物质	得量/g	ED_{50}/(μg/mL)
泽兰苦内酯(euparotin,**18**)	1.2	2.9
乙酰泽兰苦内酯(euparotin acetate,**19**)	6	0.29
泽兰氯内酯(eupachlorin,**20**)	0.95	2.6
乙酰泽兰氯内酯(eupachlorin acetate,**21**)	7	
泽兰氧化苦内酯(eupatoroxin,**22**)	1.5	
圆叶泽兰苦内酯(eupatundin,**23**)	3.9	0.80
泽兰氧化氯内酯(eupachloroxin,**24**)	0.25	2.4
10-表-泽兰氧化苦内酯(10-*epi*-eupatoroxin,**25**)	0.6	

18 R =H
19 R =Ac

20 R =H
21 R =Ac

22

23

24

25

此工作是最早报道从植物中分离得到含氯倍半萜类的例子,但值得注意的是,倍半萜类的环氧(epoxy)衍生物于硅胶层析过程中,如果用氯仿作洗脱剂,常发生氧环开裂而成氯取代物。酯侧链上的环氧也可能开裂,而泽兰中泽兰苦内酯与其相应的含氯内酯共同存在。这种环开裂的现象,可能是氯仿中含有或分解产生微量盐酸的缘故。此工作是典型的以生物试验筛选与化学分离密切配合,成功地分离得到有效成分的实例,对中草药研究很有实用价值。特别是近年来,往往以生化方法即对某种特定酶的抑制作用作为第一筛,生物试验达到微量化,因此这种研究思路和方法能广泛推广使用。

一般天然有机化合物分子于质谱条件下,能离子化而形成分子离子峰,于离子

化电压条件下又能碎片化。各种化学物质有其各自的碎片化规律,这些都能利用质谱得到检测。30 多年前,前人已成功运用 GC-MS 以分析挥发性物质,但 LC-MS 联用远较 GC-MS 复杂。主要面对远比分析溶质量多数百倍以上的洗脱溶剂进入质谱的真空系统,溶剂蒸气的除去以及天然产物类型及化学性质的复杂性也给 MS 造成了较大的困难。经过 20 多年的悉心研究取得成功,目前采用的技术有电喷雾液质联用(electrospray LC-MS, ES LC-MS)、热喷雾液质联用(thermospray LC-MS, TSP LC-MS)和 Frit-FAB LC-MS。目前 TSP LC-MS 已成功用于相对分子质量为 200~ 1000 的天然产物,诸如黄酮、香豆素、裀酮、儿茶素、酚性化合物、木酯体、环烯醚萜、倍半萜、二萜、三萜、甾体、类脂体、单糖、低聚糖、皂苷等,基本覆盖了高分子以外的大部分植物成分[11]。

倍半萜内酯类化合物一般不容易气化,高温气化则容易发生热分解,因此该类化合物较难用 GC-MS 检测。而该类化合物一般紫外无特征吸收,220nm 以下低波长又缺乏专特性,采用视差析光和蒸发散射通用的检测手段则灵敏度较低,且不能显示检测物质的结构信息,TSP-LC-MS 用于倍半萜内酯则是较好的选择。

青蒿素(**42**)是倍半萜一族中具有重要生理作用的一类,它的含量测定作为质量控制指标一直是个问题,特别是从植物中测定青蒿素含量,由于青蒿素对紫外的吸收主要在 220nm 左右的内酯吸收,其消光系数为 10^3,因此少量酚性杂质未除尽往往能对检测产生极大的干扰。另外,青蒿素对热不稳定,因此 TSP LC-MS 较为适用[12]。黄花蒿以二氯甲烷提取,以提取物作分析,柱采用 RP-18 Nucleosil 以 CH_3CN∶ H_2O(0. 05TFA)从 50∶ 50 到 75∶ 25 梯度洗脱,正离子形式采用乙酸胺 TSP 质谱出现准离子峰,为 *m/z* 283 [M + H]、300[M + NH_4]和 341 [M + CH_3CN + NH_4]。另外,以氯仿提取菊科植物 *Centaurea solstitialis*,检测其中的倍半萜内酯[13],HPLC 柱用 RP-18 Novapak,以 CH_3CN∶ H_2O 从 15∶ 85 至 45∶ 55 梯度层析,检出其中相对分子质量各为 380、418 和 452 三个化合物,鉴定为 **26**、**27** 和 **28**。

	R_1	R_2	R_3
26	—O—		
27	Cl	OH	
28	Cl	OH	

近年已开始使用 LC-MS 和 LC-NMR 结合的方法,作为研究天然产物的工具,对植物、海洋生物、微生物次级代谢产物进行的研究,无疑又是一大突破。大体方法如 Kraus 等对 *Vernonia fastigiata* 中倍半萜的研究工作[14]。方法是将

*Vernonia fastigiata*全植物以乙酸乙酯提取,提取物用旋转腔逆流层析(rotatory locular countercurrent chromatography)。溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(9∶1∶5∶5),收集对枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)有显著抑制活性的流分。该部位先以 MeOH-H_2O 梯度洗脱,LC-UV 检测,质谱检出得准分子离子峰(m/z)分别为 379、381、437、421、423、435、463、421、468。另外,该部位做 LC-MS,吸附柱为 RP-18,以乙腈-水洗脱,30min 内乙腈浓度从 15%增至 40%,再经 30min 从 40%增至 100%,流速为 0.7mL/min,各峰检测其分子离子峰及相应的碎片峰,也能得 9 个 vernosistifolide 倍半萜内酯化合物。它们的酯侧链分别为 Methac、*i*-Bu、Ang 和 Ac。LC-NMR 仍采用上述 LC-MS 的同样条件,将上述 9 种化合物直接测出 NMR 图谱及数据,按 LC-NMR 谱数据解析推定 9 种化合的结构为 **29**~**37**。

	R_1	R_2	R_3
29	H	Methac	H
30	H	*i*-Bu	H
31	H	Methac	Ac
32	H	*i*-Bu	Ac
33	H	ANG	Ac
34	H	Methac	Ac

	R_1	R_2	R_3
35	H	Methac	Ac
36	H	*i*-Bu	Ac

	R_1	R_2	R_3
37	H	Methac	Ac

LC-MS 和 LC-NMR 方法结合使用提供了一种快速分离分析植物、海洋生物和细菌发酵产物化学成分,推定已知及新化合物结构的方法,其重要意义在于打破了过去必须分离得到纯化合物才能进行结构研究推导的传统方法。虽然这种方法的使用目前还处于初期,但 NMR 方法的灵敏度远较 MS 为低,因此目前这种微量和超微量的方法特别对含量较低的成分的分析鉴定,在方法学上还存在一定难度,由于 NMR 谱对推定天然产物结构的极大重要性,随着时间的转移和 NMR 技术的快速发展,预期将很快成为普遍使用的常规方法。

第二节　倍半萜的光谱解析

一、紫外、红外光谱和质谱

倍半萜类基本母核本身没有共同的发色团,因此紫外光谱无特征吸收,结构中如有内酯环,一般在 200~210nm 有吸收峰,但是特征性不强,如结构中有共轭系统,则其紫外吸收与一般紫外光谱的规律一致。

红外光谱对倍半萜类主要在羰基的性质确定极为重要,而指纹区的解析则比较困难,也缺乏专一性。但从红外光谱解析羰基存在形式比较专特,比较实用。一般的羰基红外吸收见表 6－2。

表 6－2　一般羰基的红外吸收峰

物质	ν/cm^{-1}	物质	ν/cm^{-1}
一般酯类的吸收	1735～1750	酸	1700～1725
δ-内酯	1735～1750	环戊烷酮	1735～1750
γ-内酯	1760～1780	环己烷酮	1700～1725
α,β-不饱和-γ-内酯	1740～1760	环己烯酮	1665～1690
β-内酯	～1840	环戊烯酮	1690～1710
醛	1720～1740	α,β-不饱和醛	1685～1710

倍半萜类的质谱碎片化规律,由于基本骨架或取代基位置的不同而有很大变化,因而对基本骨架来说,首先能解决分子离子峰,但对分子中含有 OH 或 OCOR,则分子离子峰在电子轰击质谱中常不出现或者很弱,而主要出现脱水或 McLafferty 重排而失去酸部分[M－RCOOH]$^+$ 峰,而分子离子峰则需用 CI、FAB 或 FD 质谱测定,并可再从 EI 质谱推定酯侧链,如 provincialin (**38**)。其酯侧链碎片化规律如下:

38

二、倍半萜类的^{1}H-NMR

由于倍半萜化合物一般碳原子均为 15 个,但实际上经常会超过 15 个,其结构解析顺序如下:①考虑是否具有酯侧链,具有酯侧链的化合物红外光谱具有酯羰基吸收。具有酯侧链的倍半萜,质谱很容易丢失其酸部分。因此,可从 FAB-MS 化学离子源质谱(CI-MS)或场解吸质谱(FD-MS)测得正确的分子离子峰。再从分子离子峰及丢失的酯侧链质量数推定其 C、H、O 原子个数。最后从^{1}H-NMR 谱中解析其酯部分。②检查甲基及环外亚甲基信号,由于倍半萜系由 3 个单元的异戊烯首尾连接形

成,即是由其生源前体麝香子醇按各种不同方式环合。因此环合时必然留下一些甲基或环外亚甲基,如未经进一步裂环则一般为 3 个,而且它们的相对位置大致是固定的,这些质子信号比较容易辨认,而这些甲基及环外亚甲基的解析往往对推定基本母核有用处。③解析邻接于氧原子的质子,一般邻接于醚化学位移为 3. 4~ 4. 6ppm,邻接于酯基团化学位移为 4. 9~ 5. 9ppm。如果邻接于氧的质子,其 β-位有羟基或双键等,则化学位移值向低场转移,而邻接 OH 和双键二者,则质子化学位移在 4. 5ppm 以上,并可高达 6. 00ppm。一般邻接环氧的质子化学位移为 1. 6~ 2. 8ppm,如邻近有 α-位羟基或酮基,则化学位移可高达 3. 4ppm,邻接内酯环上氧原子的质子,对各种类型化合物常有差异。鉴别时要根据其他光谱数据及生源角度统一分析。

由于倍半萜类结构类型很多,研究结构必须借助于去偶技术,通过照射确定各组质子的归属。一般去偶首先从低场部分的烯质子及邻接于氧原子的质子开始,顺序搞清各组质子的相互偶合关系,并确定其归属。随着二维谱技术的发展,目前则主要按二维谱的相关点,解析各组质子的连接关系。

应用高兆赫核磁共振解析立体化学问题在倍半萜结构研究中极为重要,该方法主要利用下列原理:①核磁共振谱裂分常数的大小与其相对的立体化学关系密切,主要利用质子间的两面角关系解析其立体配位;②官能团间不同的立体位置,屏蔽作用不同;③原子与原子间的 NOE。

三、倍半萜类的 ^{13}C-NMR

^{13}C-NMR 是 20 世纪 70 年代发展起来的技术,也是测定天然产物化学结构的重要工具之一。一般 ^{13}C-NMR 是通过宽带去偶(或称质子噪声去偶)使化合物中不同类型的碳原子得到不同的化学位移信息,每一个碳原子都能得到一个碳原子信号。再使用 INEPT 或 DEPT 等技术以区分伯碳、仲碳、叔碳和季碳。

从 ^{13}C-NMR 中各组信号的化学位移,可判断该碳原子的大致化学环境,由于 ^{13}C-NMR谱宽一般为 0~ 240ppm,各个原子或基团间和各向异性效应的影响远较 ^{1}H-NMR 为小。因此化学位移与结构间的关系,比 ^{1}H-NMR 有较大的规律性。

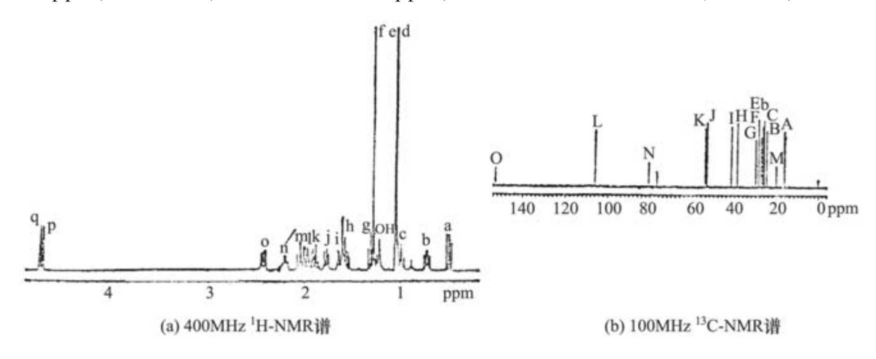
应用波谱推定天然产物结构,是一门比较复杂的学问,特别对一些光谱知识不是非常丰富的科学工作者来说,最重要的方法是与模型化合物做比较,参照前人报道的结果解决具体问题。

【例 6-3】 结构研究实例——spathulenol 的结构

在 20 世纪 50 年代以前天然产物的结构研究一般被认为是相当复杂艰巨的研究工作,主要靠设计大量降解反应,鉴定降解产物(降解到已知化合物,或经人工合成降解产物而确证),根据一系列化学降解产物,逆向推理,推定起始产物的结构。核磁共振技术的发展,特别是近代二维谱技术,使波谱技术在天然产物结构研究中成为常规工作。

20 世纪 70 年代超导磁铁和脉冲傅里叶变换技术的进步,导致核磁共振仪器、NMR 测定技术和数据处理上产生了飞跃,出现了 400MHz、600MHz 等核磁共振仪器。现以 spathulenol 为例介绍其具体应用。

从柚子的芳香油中分得一种倍半萜成分 spathulenol (**39**),进行了一系列核磁共振测试。^{1}H-NMR 400MHz,^{13}C-NMR 100MHz。Spathulenol ^{1}H-NMR 谱有 18 组共振信号,共 24 个质子。q、p、o、n、m、l、k、j、i、h、g、f、OH、e、d、c、b、a,其中 f、e、d 为甲基质子,q 与 p 为烯质子。C-NMR 有 15 组信号,为 15 个碳原子,O、L、N、K、J、I、H、G、F、E、D、C、B、M、A,其中 O 化学位移 152ppm,L 化学位移 106ppm,为双键碳,N 化学位移为 81ppm,是邻接于 OH 的碳原子(图 6-1)。



(a) 400MHz ^{1}H-NMR谱　　(b) 100MHz ^{13}C-NMR谱

图 6-1　Spathulenol 的核磁共振谱

(大写代表碳原子,小写代表氢原子)

^{13}C-NMR 经 INEPT 的测定:CH_2 为 5 个,即 I、H、D、B、L;CH_3 为 3 个,即 A、C、F;CH 为 4 个,即 K、J、G、E;其余 M、N、O 均为季碳。**39** 的 ^{1}H-^{13}C 化学位移相关二维谱,出现 Jn、Kg、Ih、Ij、Ho、Hm、Ga、Fe、Cf、Di、Dk、Bl、Bc、Ad、Eb 相关。

从 ^{1}H-^{1}H 化学位移相关二维谱,得知各组质子的偶合关系计为 ab、ag、bc、bl、cl、cm、co、gn、hi、hj、hk、ik、in、ji、jk、lo、lm、(nk)。因而可推测出 spathulenol 结构中具有下列片段

```
     h    i         g    a    b    c    m
     |    |    |    |    |    |    |    |          |                |
  —I —D —J —K —G —E —B —H        —M—          —N—OH
     |    |    |    |    |    |    |    |          |                |
     j    k    n                   l    o

      |           |           |              p       q
  f—C—f     d—A—d     e—F—e              \   /
      |           |           |                  L
      f           d           e                  ‖
                                                /O\
```

远程偶合$^1H-^1H$相关二维谱中出现的长程偶合关系有ae、be、co、gj、mp、nq和hf，$^1H-^1H$长程偶合相关谱主要用于解析季碳的连接方式及环的连接。从上述的结构片段中看出pm、qn有长程偶合关系，因此O原子应于J和H原子间插入；hf的交叉表示有一个季碳应于C和I间插入；ae，be的交叉峰表示一个季碳于G，E与F间插入并构成一个三元环；gj的交叉峰表示一个季碳于I和K间插入，因此它们间的相互关系如**39**所示。其余的问题是另有一个OH和甲基的连接问题，换句话说，spathulenol的平面结构有**40**和**41**两种可能。

39　　**40**　　**41**

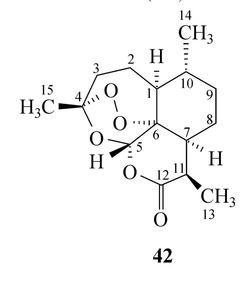
Spathulenol的立体结构主要通过NOE相关谱和NOE差谱来解决。NOE相关二维谱显示ab、ae、af、be、dg、hf、hj、ik、jk、cl、om、kq、op各对质子间有NOE。NOE差谱表示d与g有NOE，e与a、b、l有NOE，f与a、h有NOE，a与b、e、f、n有NOE。按这些核Overhauser效应推定spathulenol的立体结构式为**39**，同时也说明了spathulenol的平面结构式应为**41**[15]。

该工作是典型的用核磁共振二维谱推定结构的实例，虽然当时使用的二维谱还是处于发展初期，但已显示出其重要的应用价值。但对于结构复杂的化合物，在实际工作中往往是结合各种波谱技术综合解析结构。

进入20世纪90年代以来，NMR二维谱技术得到了极大的发展。应用的技术也名目繁多，有些技术性能近似。按我们的实践，在推定天然产物结构使用上最有使用价值的二维谱包括^1H同核相关谱($^1H-^1H$ COSY)、$^1H-^{13}C$异核相关谱($^1H-^{13}C$ COSY)、NOE相关谱(NOESY)、^1H探测异核多量子相干谱(HMQC)和^1H-探测异核多键连接谱(HMBC)。HMQC和HMBC谱的实例参见“青蒿素的波谱解析”部分。

第三节　青蒿素的化学、药理和临床

青蒿素(**42**)是截疟古方青蒿鳖甲汤的主药,青蒿为菊科(Compositae)植物。



42

一般药材青蒿常用的为黄花蒿(*Artemisia annua*)和青蒿(*A. apiacea*),20世纪60年代在广泛筛选抗疟植物药的过程中,发现黄花蒿的乙醇提取物对鼠疟(*Plasmodium berghai*)具有快速杀灭疟原虫的作用,从中分得抗疟有效成分,为一种新倍半萜内酯,定名为青蒿素(artemisinin, qinghaosu)。青蒿素为无色结晶,$[\alpha]_D^{20}$ 为 +69 (c = 0.5, $CHCl_3$),分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$。关于青蒿素的化学和药学性质,Ziffer[16] 和 Luo[17] 等已有较全面的综述。

一、青蒿素的化学性质

青蒿素极易被 $FeSO_4$ 还原,易与三苯磷反应,且质谱中有 m/z 250,即 $[H-32]^+$。推测分子中有过氧基团。青蒿素化学性质比较稳定,但遇强碱很快溶解,于内酯环打开的同时发生重排和分解。

青蒿素以 Zn + HCl 还原,或以 $Pd/CaCO_3$ 接触氢化主要得到去氧青蒿素(**43**),如果以 $NaBH_4$ 还原,则羰基还原成二氢青蒿素的α-**45** 及β-**44** 异构体的混合物,而不影响过氧键。二氢青蒿素如果于甲醇溶液中以 BF_3 催化,则甲基化形成相应的蒿甲醚β-体(**46**)和α-体(**47**),其中蒿甲醚β-体容易结晶,易于溶液中析出。另外,青蒿素于甲醇溶液中以 $NaBH_4$ 还原时,反应完毕加 HCl 分解 $NaBH_4$,如果加入过量的 HCl 放置,二氢青蒿素也能甲基化而转化成蒿甲醚,得率也同样很高,工业化生产主要用此法。

43

44 R=H
46 R=CH_3

\+

45 R=H
47 R=CH_3

二、青蒿素的波谱解析

青蒿素结构中仅有内酯基团而无其他发色团;紫外光谱 220nm 以上无吸收;红外光谱有 δ-内酯的 1745cm^{-1} 和过氧醚的 831cm^{-1}、881cm^{-1}、1115cm^{-1} 吸收等;高分辨质谱分子离子峰 m/z 为 282.1472;分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$;核磁共振谱于 $CDCl_3$ 中高场处有重叠,用 DMSO-d_6 作溶剂较佳。其^{1}H-NMR 各组质子归属如下:

H-1α 1.29 m;H-2α 1.92 ddd (3.4,7.1,10.5);H-2β 1.32 m;H-3α 2.66 ddd;H-3β 2.06 ddd (4.2,4.2,13.3);H-5β 6.11 s;H-7α 1.78 ddd (3.7,3.5,13.2);H-8α 1.71 dddd (3.3,3.3,3.3,13.2);H-8β 1.14 dddd (3.0,13.1,13.1,13.1);H-9α 1.00 dddd (3.5,12.2,12.2,12.2);H-9β 1.63 dddd (3.3,3.3,3.3,12.5);H-10β 1.51 m;H-11α 3.15 dq (8.7);H-13 1.06 d (7.3);H-14 0.91 d (3.4);H-15 1.34 s。

(1) 青蒿素的^{1}H-NMR 谱解析

青蒿素^{1}H-NMR 谱各组信号的化学位移和峰形放大见图 6－2。分子中:1α、2β、3α、7α、8β、9α、10β 均为直立键;2α、3β、8α、9β 均为平伏键。各组的两面角关系参见放大^{1}H-NMR 谱中所列。其中 1α、2β;2β、3α;7α、8β;8β、9α;9α、10β 夹角约为

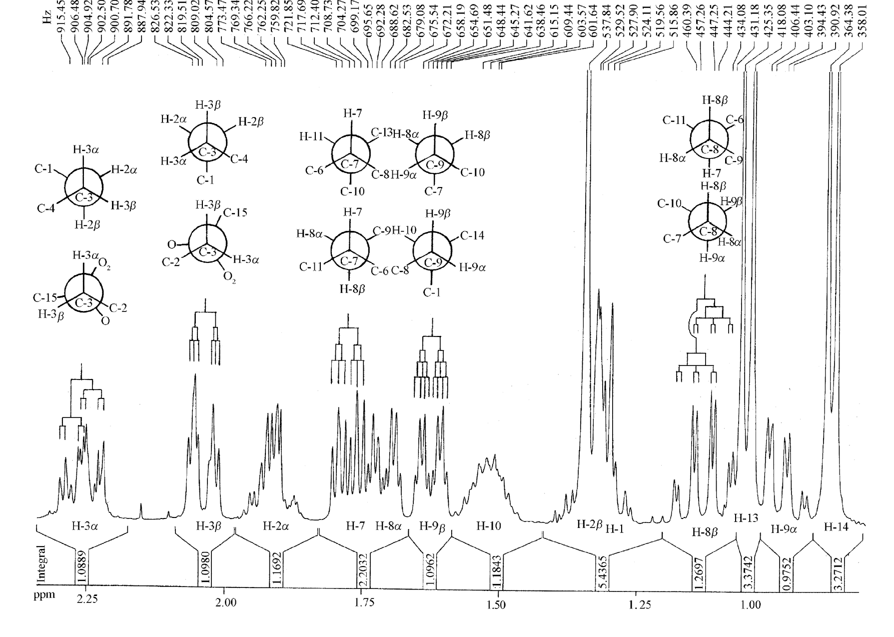


图 6－2 青蒿素的^{1}H-NMR 谱放大图

180°,裂分常数为 13~ 14。1α、2α;2α、3α;2α、3β;7α、8α;8α、9β;9β、10β 夹角约为 45°,裂分常数为 4~ 5。2α、2β;3α、3β;8α、8β;9α、9β;各组同碳偶合裂分常数为 14~ 15。各组的峰形大部分比较典型。

青蒿素 C-NMR 谱具有 15 个碳原子信号,DEPT 实验其中 3 个 s 峰、5 个 d 峰、4 个 t 峰、3 个 q 峰。按一般化学位移规律及各种二维谱确定归属如下:

C-1 49. 468 d; C-2 24. 352 t; C-3 35. 468 t; C-4 104. 709 s; C-5 93. 277 d; C-6 79. 564 s; C-7 43. 881 d; C-8 22. 414 t; C-9 33. 126 t; C-10 36. 076 d; C-11 32. 515 d; C-12 171. 493 s; C-13 12. 404 q; C-14 19. 560 q; C-15 24. 927 q

(2) 青蒿素的 HMBC 和 HMQC 谱

HMQC 谱和 HMBC 谱是近 10 年来发展并广泛应用于天然产物化学研究的核磁共振技术,根据化合物 ^{1}H-NMR 谱的归属可通过 HMQC 谱确定各组碳信号的归属。再通过氢谱观察其隔二键、隔三键的碳原子。大大提高了推定天然产物结构正确性。

青蒿素的 HMQC 和 HMBC 谱相关关系归纳见表 6-3。

表 6-3 青蒿素的 HMQC 和 HMBC 谱

质子化学位移及归属		HMQC 相关 C 信号及归属		HMBC 相关 C 信号
H-1α	1. 29	C-1	49. 486	C-14, C-7, C-6, C-5
H-2α	1. 92	C-2	24. 362	C-1, C-4
2β	1. 32			C-3, C-4
H-3α	2. 26	C-3	36. 076	C-2, C-4
3β	2. 04			C-2, C-4, C-1
		C-4	104. 709	
H-5β	6. 11	C-5	93. 277	C-1, C-6, C-4, C-12
		C-6	79. 584	
H-7α	1. 78	C-7	43. 881	C-8, C-9, C-1, C-6, C-5, C-12
H-8α	1. 00	C-8	22. 414	C-6
8β	1. 63			C-7
		C-9	35. 464	
H-10β	1. 51	C-10	38. 874	C-14, C-2
H-11α	3. 15	C-11	33. 126	C-13, C-8, C-7, C-12
		C-12	171. 493	
H-13	1. 06	C-13	12. 404	C-11, C-7, C-12
H-14	0. 91	C-14	19. 560	C-9, C-10, C-1
H-15	1. 34	C-15	32. 515	C-3

三、青蒿素及其衍生物的药理与临床

青蒿素为一新类型的抗疟药,具有高效、速效、低毒的特点。体外实验于 20~50μg/mL 对疟原虫有直接杀灭作用,对鼠疟(伯氏疟原虫) *P. berghai* 抗氯喹虫株 90%抑制剂量 SD_{90} 为 6mg/kg,抗疟作用主要作用于红细胞内期,而对红细胞外期和前期均无效。其主要特点是由于结构类型和作用机制和一般抗疟药完全不同。因此,对氯喹和甲氟喹(mefloquine)无交叉抗药性。对鼠疟抗氯喹虫株 ED_{50} 为正常株的 1/3,说明对抗氯喹虫株比正常株更敏感[18]。青蒿素吸收快,分布广,代谢快(半衰期短),能透过血脑屏障。另外,以细胞水平研究青蒿素的分布特性,发现疟原虫寄生的红细胞中青蒿素类药物的浓度远较非感染的红细胞为高,二者相差在 100 倍以上,这种分布特点即在靶细胞疟原虫中积累较高的浓度,因此特别适用于抢救脑型疟和凶险型疟疾。但青蒿素类药物代谢快,血液中维持时间较短,造成青蒿素类药物复燃率高[19~21]。临床一般采用于治疗后期加服乙胺嘧啶或伯喹等疟疾预防药或抗复发药处理。

四、青蒿素的结构改造和构效关系[18,22]

由于在水中和油中的溶解度均较小,青蒿素较难制成溶液状态的针剂,如制成混悬注射液,临床使用时常出现注射部位局部疼痛。另外,对脑型疟的抢救而言,病人常处于昏迷状态。一般说针剂给药较为理想,而且溶解度问题对口服型也足以影响吸收和生物利用,因此,青蒿素作为先导,进行结构改造,寻找疗效高、使用方便、无毒副作用的新药就显得非常重要。

青蒿素的结构中仅含过氧、内酯和缩醛官能团,各种化学反应往往首先影响过氧结构,失去过氧后抗疟作用也同时失去,因此从青蒿素直接进行结构改造往往比较困难。由于青蒿素以 $NaBH_4$ 还原不影响过氧,将内酯羰基还原成羟基,所得的二氢青蒿素保留了抗疟活性,且较青蒿素强 4 倍,因此青蒿素的结构改造早期主要以二氢青蒿素开始。

$NaBH_4$ 还原过程中,青蒿素(**42**)12-位的羰基还原成羟基,可生成α-**45** 和β-**44** 两种异构体。α-构型和β-构型都有近似的抗疟作用,因此实际工作中常不分离α-、β-两种构型的纯品,而用二者的混合物继续反应。其结构改造主要用醇类 ROH 于乙醚溶液中以 BF_3 催化而形成一系列的二氢青蒿素醚类(**48**)。若将二氢青蒿素以酸酐[$(RCO)_2O$]或酰氯(RCOCl)于吡啶或 Et_3N 中或 DMAP 中酰化,或用酸类(RCOOH)加 DCC 于 DMAP 中酯化,均能得到二氢青蒿素酯类(**49**),若采用二元酸所形成的酸酐酯化则可得 **50**。若以酰氯(ROCOCl)于吡啶中则能生成一系列二氢青蒿素碳酸酯类(**51**)。若以二元酸酐酰化则得到二元酸与两分子二氢青蒿素所形成的酯类 **52**。中国科学院上海药物研究所制备了一系列二氢青蒿素、酯类和

碳酸酯类衍生物。它们的药效筛选均采用伯氏疟原虫(*P.berghai*)鼠疟筛选法,青蒿素的90%抑制率 SD_{90} 剂量为6.20 mg/kg。醚类衍生物中以蒿甲醚(**48-1**,R = CH_3)为最强,SD_{90} 为1.02 mg/kg。通常烷基越大,抗疟作用越低。酯类衍生物中以苯甲酸酯(**49-13**,R = C_6H_5)为最强,SD_{90} 为0.48 mg/kg。碳酸酯类作用一般都较强,其中 **51-4** (R = *n*-C_3H_7)的 SD_{90} 为0.50 mg/kg。二元酸双酯类以 **52-2**[R = $(CH_2)_3$]最强,SD_{90} 为0.65mg/kg。

48

49

50 R=$(CH_2)_n$COOH

52

51

53

54

近代抗疟药活性的第一轮筛选往往考虑体外试验。美国 Walter Reed 陆军研究所和密西西比大学筛选采用恶性疟(*P. falaparum*)抗性虫株,其一为 W-2 印支克隆,另一为 D-6 塞拉利昂克隆。前者 W-2 克隆为抗氯喹而对甲氟喹敏感,后者 D-6 克隆为抗甲氟喹而对氯喹敏感。筛选结果的表达用 IC_{50} 或相对活性青蒿素指数(artemisinin indices)表示,即以青蒿素本身为1。

青蒿素指数 = IC_{50}(青蒿素对照组)/IC_{50}(衍生物)

近年来国外合成或半合成了一系列青蒿素类型化合物，它们是酰胺类 **53**[23]、水溶性酯类 **54**[24]、C-4 烷基 C-11 去甲基青蒿素类 **55**[25]、C-4 烷基 C-11 烷基青蒿素类 **56**、C-12 去羰基 C-4 烷基取代类 **57**、C-12 去羰基 C-11 烷基取代类 **58**[26]，以及三环青蒿素类、C-11 位烷基青蒿素类[27]、C-12 位含氮化合物类 **59**[28] 等，其中抗疟作用较突出的见表 6-4。

表 6-4　青蒿素及其几种衍生物的抗疟作用

化合物名称	结构编号	结构式中 R =	相对抗疟活性(青蒿素指数)	
			W-2	D-6
青蒿素	**42**		1.00	1.00
二氢青蒿素	**44 + 45**	—H	3.58	4.75
蒿甲醚	**48-1**	$—CH_3$	1.92	2.34
蒿乙醚	**48-2**	$—C_2H_5$	2.08	2.52
蒿琥酯钠	**54-1**	$—CO(CH_2)_2COONa$	3.86	4.83
	54-36	$-(S)-CH_2CH(CH_3)COOCH_3$	6.00	1.73
	54-44	$-(R)-CH(C_6H_5)COOC_2H_5$	10.8	8.00
	54-49	$-(S)-CH(C_6H_5)COOC_2H_5$	20.70	9.30
	53-1	$—CH_3$	4.00	2.13
	55-2	$—C_2H_5$	21.20	6.73
	56-6	$—CH_2(C_2H_5)_2$	13.82	22.84
	58-5	$n\text{-}C_4H_9$	58.26	20.90
	58-7	$—(CH_2)_3C_6H_5$	50.73	24.06
	58-8	$—(CH_2)_3C_6H_4\text{-}p\text{-}Cl$	69.90	33.17
	57-2	$n\text{-}C_3H_7$	7.22	6.85

从上述筛选结果，化合物 **58-8** 为迄今抗疟作用最强的青蒿素类化合物，虽然这些体外试验结果未必完全代表动物及临床疗效，但对学术上和开发新抗疟药均有重要价值。

R　O　O　O　H　H　O　O　CH_3　H

55

R　O　O　O　H　H　O　O　CH_3　H　$(CH_2)_3CH_3$

56

R　O　O　O　H　H　O　CH_3　H

57

58

59

第四节 特殊类型及近年进展

近10多年来,倍半萜类仍是天然产物化学中极为活跃的研究领域,青蒿素抗疟作用的发现,促进了天然过氧化合物的研究。天然过氧化合物一般有过氧羟基化合物和过氧醚类,前者化学性质相对较不稳定,而后者有时相当稳定。从 *Artemisia abrotannum* 中分离得到 arteincultone (**60**)、epiarteincultone (**61**)及 **62**~**65**,**62**~**65** 结构比较特别[29],具有过氧螺环缩酮结构。Arteincultone (**60**)对恶性疟原虫有中等程度抗疟活性。鹰爪 *Artabotrys uncinatus* 是我国海南岛产的番荔枝科植物,早期发现其对伯氏疟原虫有抗疟作用,从中分离得到两种有效成分鹰爪素 A (**66**)和 B(**67**)[30]。并已人工合成成功,鹰爪素的抗疟作用的发现早于青蒿素,其类似物的合成和抗疟作用的筛选尚在进行中[31]。

60 61 62

63 64 65

66 67

天然界存在不少二聚倍半萜,个别还存在三聚体。早期从中药刘寄奴(*Artemis-*

ia anomala)中分离得到二聚体 artanomaloid (**68**)[32]。从 *Artemisia selengensis* 中曾分离得到 arteminolides A~ F,其后又分得 artselenoid (**69**),这些化合物都是由两种不同的倍半萜内酯经分子间 Diels-Alder 反应生成的。日本金粟兰 *Chloranthus japonica* 中含有二聚体 shizukaol (**70**)和三聚体 trishizukaol (**71**)[33]。

68

69

70

71

从海洋生物及真菌产物中分离到不少倍半萜与酚性物质结合的化学成分,如从真菌 *Penicillium simplicimum* 得 simplicissin (**72**),**72** 具有花粉生长抑制作用。从真菌 LL-23G227 中得抗菌物质 hongoquercin A (**73**)、B(**74**)和(+)-hyatellaquinone (**75**)[34,35]。近年从蕨类植物中分得倍半萜与间苯三酚的结合物,如从香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans*)中得 dryofragin,从 *D. atrata* 中得 phloroglucinol A、B[36]。

72

73 R=H
74 R=OAc

75

从 *Stachybotrys* sp.中分得含氮倍半萜类化合物 **76**、**77** 及其二聚体 **78**,**77** 和 **78** 均为内皮细胞受体 endothelin 拮抗剂。含氮化合物广义地说均可列入生物碱范畴。番荔枝科鸡爪树属植物 *Polyalthia oliveri* 中分离得到倍半萜生物碱

polyathenol (**79**)、olyveoline (**80**)、sopolyalthenol (**81**) 和 neopolyalthenol (**82**)[37]。从放线菌 *Actinomycetes* 属 MST-8651 菌种的发酵液中分离得到一系列 drimentine 类型结构的生物碱,该类型化合物具有抗菌和抗肿瘤活性[38]。

76 **77**

78 **79**

80 **81** **82**

从中药白术(*Atractylodes macrocephala*)中分得倍半萜内酰胺(atractylenolactam, **83**)[39],类似物 **84** 也从海洋软珊瑚 *Clavularia inflata* 中分离得到[40]。

此外,从海洋生物中分离得到倍半萜含氮化合物,从贪婪倔海绵(*Dysidea avara*)中得到 4-methylaminoavarone (**85**),从海洋生物中还可分离得到一系列磺酸基化合物,形成水溶性盐,从美丽海绵属 *Callyspongia* 中分离得到的 akaterpin (**86**)具有抑制磷酸化酶活性[41]。Ispidospermidin (**87**)得自 *Chaeronema hispidulum*,是结构新颖的磷酸化酶-C 抑制剂[42]。天然界还存在一些与氨基酸结合的倍半萜,诸如得自 Spongiidae 科海绵的 nakijiquinone A (**88**)和 B (**89**),二者均有抗真菌活性[43]。

83　　84

87　　88　　89

前述的一系列倍半萜类化合物结构奇特,体现出自然界在生物合成中的鬼斧神工。其生理作用值得进一步筛选研究,这也为天然产物工作提供了广阔的工作领域。

参 考 文 献

[1] Fischer N H et al. Prog Chem Natural Products, 1979, 38:47~390

[2] Fraga B M. Nat Prod Rep, 1995, 12:303

[3] Fraga B M. Nat Prod Rep, 1996, 13:307

[4] Fraga B M. Nat Prod Rep, 1997, 14:145

[5] Fraga B M. Nat Prod Rep, 1998, 15:73

[6] Fraga B M. Nat Prod Rep, 1999, 16:21

[7] Fraga B M. Nat Prod Rep, 1999, 16:711

[8] Fraga B M. Nat Prod Rep, 2000, 17:483

[9] 陈仲良. 化学通报, 1984, 57

[10] Kupchan S M et al. J Org Chem, 1969, 34:3876

[11] Wolfender J L et al. Phytochem Analysis, 1994, 5:153

[12] Mailard M P et al. J Chromatogr, 1993, 647:147
[13] Hamburger M et al. Nat Toxins, 1993, 1:315
[14] Vogler B et al. J Nat Prod, 1998, 61:175
[15] 稻垣冬彦. 化学领域, 1983, 141(增刊): 1
[16] Ziffer H et al. Fortschritt Chem Naturstoff, 1997,72:121
[17] Luo X D, Shen C C. Med Res Rev, 1987, 7:29
[18] Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group. Chin Med J, 1979, 92:811
[19] 朱大元等. 药学学报, 1980, 15:509
[20] 朱大元等. 中国药理学报, 1983, 4:194
[21] Gu H M et al. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984, 78:265
[22] Chin Cooperative Research Group on Quinhaosu and Its Derivatives as Antimalarials. J Trad Chin Med, 1982, 2:45
[23] Avery M A et al. J Med Chem, 1995, 38:5038
[24] (a) Lin A G et al. J Med Chem, 1989, 32:1247
(b) Lin A G et al. J Med Chem, 1995, 38:764
[25] Avery M A et al. J Med Chem, 1996, 39:2900
[26] Avery M A et al. J Med Chem, 1996, 39:4149
[27] Ma J et al. Bioorg. Med Chem Lett, 2000, 10:1601
[28] Lin A J et al. J Med Chem, 1990, 33:2610
[29] Marco J A et al. J Nat Prod, 1994, 57:939
[30] 梁晓天等. 化学学报, 1979, 37:215
[31] (a) Casteel D A. Antimalarial Agents. In: Wolf M E (Ed). Burger's Medicinal Chem and Drug Discovery. New York: Wiley,1997
(b) Hofheinz W et al. Trop Med Parasitol, 1994, 45:261
[32] Jakopovic J et al. Phytochem, 1987, 26:2777
[33] Kawabata J et al. Phytochem, 1998, 47:231
[34] Roll D M et al. J Antibiot, 1998, 51:635
[35] Abbanal D A et al. J Antibiot, 1998, 51:708
[36] Fuchino H et al. Chem Pharm Bull, 1997, 45:1101
[37] Kunesch N et al. Tetrahedron Lett, 1985, 26:4937
[38] (a) Lacey E et al. PCT Int. Appl., WO 1998, 9809968
(b) Lacey E et al. PCT Int. Appl., CA 1998, 128, 217535
[39] Chen C Z et al. Phytochem, 1997, 45:765
[40] Patit A D et al. J Nat Prod, 1997, 60:507
[41] Fukami A et al. Trahedron Lett, 1997, 38:1201
[42] Hashimoto T et al. Tetrahedron Lett, 1994, 35:4787
[43] Shigemori H et al. Tetrahedron, 1994, 50:8347

第七章 昆虫激素与信息素

第一节 概 述

我们周围化学物质很多,一头雄蛾可嗅到1km外雌蛾的气味,但人感觉不到。据估计,世界上至少有2万余种植物和昆虫有着密切的相互依存关系。这些植物种类在生长发育过程中产生约10万种次生代谢产物,其中有4万~5万种已鉴定出化学结构。这些代谢产物中的大部分对植物正常生长发育并不很重要,它们却在植物与昆虫相互依存关系中显得非常重要。

植物释放的化学信息可分为两类:一类是植物本身在生长发育过程中所释放的挥发性气味物质,这些气味物质诱导着昆虫产生寄主定向行为、逃避行为、产卵场所选择行为、刺激雌雄交配、取食、聚集和传粉行为等;另一类化学信息则是植物受到昆虫攻击后才产生和释放的,这些化学信息招引捕捉性天敌来抵御外来害虫的攻击,起着互利素的作用,或是释放一些气味物质作为同种植物个体间的告警化学信号,有的甚至释放能抑制植食性昆虫幼虫取食的化学物质等。

20世纪70年代初,关于动植物间相互作用的生物化学研究成果引起人们的兴趣,化学生态学(chemical ecology)应运而生,它是人们了解自然的一把钥匙。随着近代超微量化学分析技术的飞速发展,已可测定毫微量级的样品(1ng纯化学物质即可确定出化学结构),大大促进了昆虫激素与信息素的研究。

1975年在美国创刊 *Journal of Chemical Ecology*,其中有关昆虫的内容占60%~80%。法国有机化学家 Barbier 所著的 *Introduction to Chemical Ecology* 中对化学生态学的定义是:研究活着的生物之间以及生物和矿物之间的化学相互作用的科学。他把1792年 Lavoisier(拉瓦锡)提出的物质大循环的概念都包括在上述定义中了,故他称化学生态学是最完整的生态学,他把过去的个体生态学、种群生态学、群体生态学都包括在内,包括三流(物质流、能量流、信息流)。他对上述三种生态学的提法是:个体生态学(autecology)、同种生物生态学(demecology)和多种生物生态学(synecology)。许多生态学分支是研究物质流和能量流的,如能量生态学、营养生态学等,而化学生态学主要是研究信息流,信息流是带有信息的特殊物质。植物与动物的关系是化学、生态学最热门的研究领域,强调植物中的次生性代谢物与动物关系极大。

图7-1中简示出各种信息化合物在昆虫大脑神经中的作用位点。

据报道,已知的昆虫在100万种以上,占陆地动物种类的4/5,这是由于其独

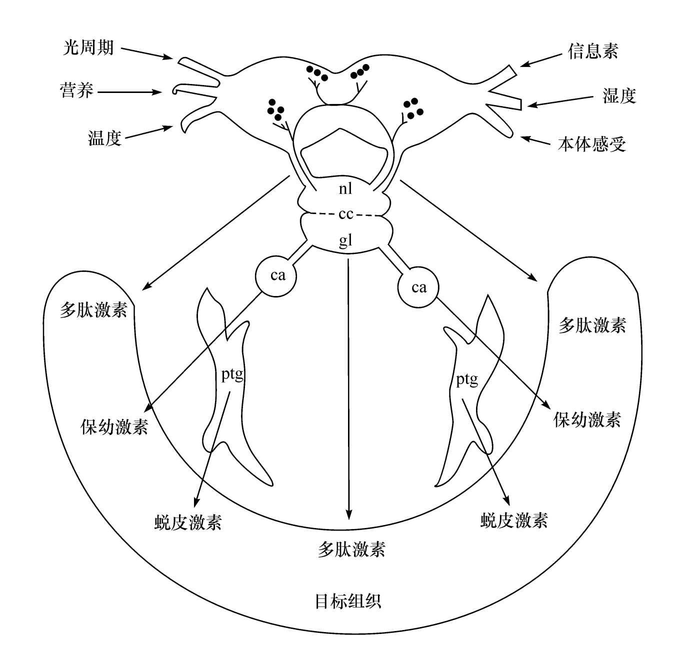


图 7－1　理想化的昆虫大脑心侧体(cc)、咽侧体(ca)、前胸腺(ptg)及其外围组织示意图
反映了一些相关的刺激和分泌。黑点代表神经分泌细胞；
nl 代表神经分泌细胞圆突；gl 代表心侧体的腺状圆突

特的生命过程和适应周围环境的能力。昆虫在一生的发育过程中形态要发生十分明显的变化：从卵到幼虫，经过蛹变成成虫，这个过程称为变态(metamorphosis)。控制变态过程的化学物质称为变态激素(metamorphosis hormone)，即一般所指的昆虫激素。根据作用不同，又可分为脑激素、蜕皮激素及保幼激素。图 7－2 给出蜕皮激素和保幼激素作用于不完全变态和完全变态昆虫的生命循环各阶段的简化示意图。

昆虫向体外分泌多种化学物质，用于昆虫之间传递信息，称之为信号化合物(semio chemical)，semiochemical 一词来源于希腊语的词根“*semeion*”，其含义即为信号，信号化合物又可被称为信息化合物(infochemical)或化学信使(chemical messenger)。其中作用于同种个体间的物质，称为信息素(pheromone)，信息素一词也来源于希腊语“*pherein*”(to tranfer + hormon = to excite)，它是由昆虫分泌，可被同种生物体接收并引起一系列特定生理反应的物质的总称，信息素与激素(hormone)对比而言是一种外激素，而在异种个体间传递信息的物质称为交互化合物或它感化合物(allelochemical)。这类带有信息的物质曾有许多提法，如 Wittaker 和 Feeny 于 1971 年提出了一种分类系统：交互化合物中引起对方的生理反

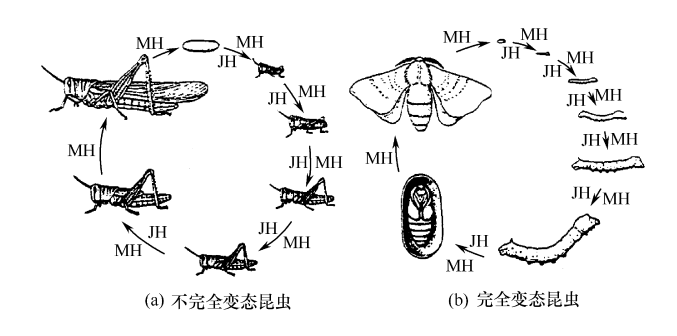


图 7-2　昆虫生命周期简化示意图
显示蜕皮激素(MH)和保幼激素(JH)的作用位点

应和行为而有利于自己的物质,称为利己素(allomone);反之,称为利他素(kairomone);还有一类物质对双方均有利,称为协同素(synomone)。另外,还有非生源协同素(apneumone)。利己素又可细分为忌避剂(repellent)、逃避物质(escape substance,如墨斗鱼)、抑制剂(suppressant,抗生素等)、毒物(venom,如蜜蜂的蜜毒)、诱导剂(inductant)[如形成虫瘿(gall)的物质]、反抗剂(conteractant)、引诱剂(attractant)等。利他素可分为化学引诱剂(chemical lure)、诱导剂(inductant,对环境适应)、警戒信号(warning signal)、刺激物(stimulant)。信息素又可分为性信息素(sex pheromone)、集合信息素(aggregation pheromone)、追踪信息素(trail pheromone)、取食信息素(feeding pheromone)及告警信息素(alarm pheromone)等。

有些信号化合物在"种内"和"种间"的划分上有时不确切,如 alarm pheromone 对一种蚜虫是逃,并对其他种蚜虫也有效,对社会性昆虫则是准备打仗。又如 sex pheromone 在适量时是性诱,过量后就对其他种起作用了。总之,有些信息素是多种作用的。上述化合物具有含量很少,生理作用显著的共同特点。

信息素效果与感受的程度取决于生物的生理状况,故诱虫时不能期望把所有的虫子诱来,个体之间的生理状态差异很大,因此不同于化学农药。又如芥子油对菜粉蝶和小菜蛾就是用量少时起引诱作用,量大时起抑制作用。信息素的使用,不是量越大越好,大过一定的阈值后效果反而不好。

与其相关的生理作用、化学分离、结构研究、化学合成、生物合成及应用研究均有详尽综述[1~8]。

第二节　昆虫变态激素

一、昆虫蜕皮激素

昆虫变态激素(moulting hormone, MH)最初发现于昆虫体内,是调节昆虫变

态的激素,如脱皮酮(ecdysone)称为蜕皮激素,是一类具有促蜕皮活性的物质,它能促进细胞生长,刺激真皮细胞分裂,产生新的表皮并使昆虫蜕皮。对于昆虫的作用在于活性特殊的遗传因子,以产生核糖核酸从而直接合成了某些适当的酶导致昆虫变态。对人体也能促进蛋白质的合成,排除体内胆甾醇降低血脂及抑制血糖上升等活性,曾用于临床。蜕皮激素是昆虫的幼虫蜕皮时必需的激素,这类甾体化合物存在于昆虫生长发育的全过程。蜕皮激素的含量极低,由于早期的实验条件及科学水平的限制,分离与结构测定都十分困难。Butenandt 和 Karlson 经过 11 年的努力,从 500kg 的蚕蛹分得 25mg 的蜕皮素结晶[9]。后来又发现此结晶含有两种成分:一种为α–蜕皮素(α–ecdysone,**1**),是主成分,另一种极性稍大的物质称为β–蜕皮素(β–ecdysone,**2**)。由于样品量少,测定结构在当时是很困难的,最后用 X 射线衍射法测定了其结构[10]。

1 **2**

二、植物蜕皮激素

在植物界中也发现有昆虫变态激素,这引起了国内外研究者的兴趣,从而对中草药中昆虫变态激素类成分的研究引起了重视。1966 年,首次报道植物界中也有昆虫变态激素的存在。1967 年,竹本长松等报道了许多中草药中的昆虫变态激素活性试验结果,发现许多羊齿类植物和不少高等植物的根、叶的提取物具有此种激素活性并自其中分离出结晶形激素,其中蕨类植物中所含蜕皮激素最多,霉菌和海藻类则无此种活性。

在α–蜕皮素结构确定不久,从植物中也分到了蜕皮激素及其类似物。例如,从台湾的民间抗癌药百日青(*Podocarpus nakaii*)中分得百日青甾酮 A(ponasterone A)[11];从中药牛膝中分得牛膝甾酮(inokosterone)[12]。由于中西香尔和竹本等的偶然发现,人们对植物进行广泛筛选,发现在植物中也广泛存在具有蜕皮激素活性的化合物。例如,中药牛膝(*Achyranthes bidentata* BL.)的根中含有脱皮甾酮(ecdysterone),即β–蜕皮素(β–ecdysone);桑树(*Morus alba* L.)叶中含有牛膝甾酮和羟基蜕皮甾酮;中药泽泻醇 A(alisol A)的结构与蜕皮激素类极相似。它们通称

为植物蜕皮素(phytoecdysone),在植物中一般含量很高,如露水草(*Cyanotis arachnoide*)中β-蜕皮素的含量在2%以上[13]。不过,人们尚未搞清植物蜕皮素的生态学意义。Horn发现116种植物具有蜕皮激素的活性并测定了40多个蜕皮激素的化学结构[14,15]。到目前为止,从植物中发现的蜕皮激素及类似物已超过100种。不过,人们尚未搞清植物蜕皮素的生态学意义。

值得注意的是,昆虫的发育和生长可被很微量的蜕皮激素控制(百万分之一浓度),而植物中的蜕皮激素含量远远高于此(占干物质重的0.1%)。显然,许多昆虫对其食用植物的蜕皮激素产生了解毒机制。因此,保幼激素和蜕皮激素在农作物害虫防治中还难以像上述昆虫行为信息素那样实用。

三、抗蜕皮激素

植物中除蜕皮激素以外,还含有抗蜕皮激素(anti-ecdysterone),其自身无蜕皮激素活性,而对某些蜕皮激素有拮抗作用,如果含量高的话,可用于杀虫,将有实用价值。例如,唇形科筋骨草(*Ajuga decumben*)中的筋骨草内酯(ajugalactone)[16],结构与蜕皮素十分相似,差别主要在于侧链,它没有蜕皮激素活性,能抑制百日青甾酮A的作用,但不能抑制β-蜕皮素(**2**)及川牛膝甾酮(cyasterone)的作用。

四、昆虫变态激素的提取分离和结构鉴定

(一) 分离提取

昆虫变态激素在昆虫体内含量极微,一般采用有机溶剂提取,然后用逆流分配法加以纯化。

自植物体中提取昆虫变态激素,多用甲醇为溶剂,得甲醇提取物转溶于水中,以乙醚除去脂溶性成分,再以乙酸乙酯反复萃取合并,蒸去乙酸乙酯后的残留物,有时加少量乙酸乙酯即可析出粗品。乙酸乙酯提取后不能得到结晶时,往往用氧化铝层析法可以获得纯品。

(二) 结构鉴定

昆虫变态激素为含27~30个碳原子的甾体化合物,其结构特点是甾核的C_6是酮基,C_7有双键,C_{17}是一个含氧的功能基侧链,分子中还有许多羟基,因此在水中的溶解度较大。具有变态活性的昆虫变态激素的A/B环大多是顺式,A/B环为反式的则无活性或活性减弱。

1. 紫外光谱

7-烯-6-酮型蜕皮激素具有很强的特征紫外吸收峰,λ_{max}为242nm,摩尔吸光系

数 ε为 10 000~ 16 000 mol · L^{-1} · cm^{-1}。蜕皮酮乙醇溶液,λ_{max}为 242 nm 的 ε为 12 400 mol · L^{-1} · cm^{-1},14α-羟基的引入,可使吸收峰红移至 248 nm;酸催化下脱 14α-羟基产物在λ_{max}为 244nm 和 293 nm 有吸收峰。

2. 红外光谱

蜕皮激素含有多个羟基,在 ν_{max} 为 3340~ 3500cm^{-1} 间有强吸收,α,β-不饱和酮在 1640~ 1670cm^{-1} 区间有特征吸收峰(5β-羟基蜕皮酮类可移至 1690cm^{-1}), 1650cm^{-1} 和 1605cm^{-1} 有弱的双键吸收, 含内酯基团的蜕皮激素在 1700~1800cm^{-1} 间有吸收峰。

3. 旋光谱和圆二色谱

因为蜕皮激素分子的 B 环中含有α,β-不饱和酮基,其旋光谱显示两个 Cotton 效应,在二氧六环溶液中测定,其正 Cotton 效应在 40°~ 80°间;这对确定 A/B 环的接合方式十分有用,40°~ 80°是顺式接合的特征值;5αH 衍生物显示更强的 Cotton 效应,如 5αH-20-羟基蜕皮酮,显示负 Cotton 效应,α_{240} 为 - 475°。C-7 位失去双键后,有一个在 - 160°~ - 190°之间的负的 Cotton 效应。

圆二色谱对确定 A/B 环的接合方式也十分有效,反式接合化合物的 Cotton 效应强度要比顺式的大[17]。利用二苯甲酸酯手性规则,通过其二苯甲酸酯衍生物的 CD 谱,可确定 A 环邻二羟基的绝对构型[18,19]。

4. 质谱

蜕皮激素的质谱对结构解析非常有价值,通过来自甾体母核及支链的特征碎片峰,结合核磁共振谱数据,可以得到足够的分子结构信息。

蜕皮激素的电轰击质谱(EI)通常只显示很弱的分子离子峰(~ 1%),由于分子离子峰很容易脱水,M^{+} - 18 峰会很强,然后会进一步失水。

5. 核磁共振谱

蜕皮激素在氯仿中的溶解性很差,早期 NMR 数据几乎都是从氘代吡啶、甲醇和二甲亚砜溶液中获得,现在由于高分辨核磁共振仪的普遍使用,样品量可大大降低,其 NMR 数据也可从一般溶剂的溶液中得到。

蜕皮激素的^{1}H-NMR 谱一般比较复杂,CH 和 CH_2 信号均重叠在一起,甲基信号一般呈尖锐单峰,C_{20} 羟基化后,C_{18} 和 C_{21} 位甲基明显向低场移动,α-蜕皮素的 C_{18} 和 C_{21} 位甲基信号分别在 δ0. 7 ppm 和 1. 25 ppm (d, $J = 6$ Hz)(pyridine-d_5),而β-蜕皮素相应的甲基信号却在 δ1. 20 ppm 和 1. 56 ppm。引入 14α-羟基对 C_{18} 甲基有一个很小的低场位移,在 0. 06~ 0. 08 ppm 之间,同时 C_7 位质子简化为双峰。

蜕皮激素的[13] C–NMR 谱相对于其[1] H–NMR 谱更容易辨别，C_6 位的羰基在 δ201～204ppm之间，C_7、C_8 不饱和双键碳信号分别在 δ121ppm 和 165ppm 左右；5β–H 衍生物中 C_5 碳信号在 δ～51ppm，5β–OH 衍生物 C_5 碳信号在 δ79～80ppm；5β–位羟基化后，可使 C_6 碳信号向高场移动约 2ppm，C_3 碳信号向低场移动约 1.5～2ppm，C_{19} 碳信号向高场移动 5～6ppm。

α–蜕皮素和β–蜕皮素的[1] H–NMR、[13] C–NMR 数据列于表 7–1 中。

表 7–1　α–蜕皮素(α–ecdysone)和β–蜕皮素(20–hydroxyecdysone)的[1] H–NMR 和[13] C–NMR 光谱数据 δ(ppm，以 TMS 为内标)

原子	[1] H–NMR(CD_3OD,250 MHz)		原子	[13] C–NMR(C_5D_5N,62.9 MHz)	
	α–蜕皮素	β–蜕皮素		α–蜕皮素	β–蜕皮素
1–H_a	1.43	1.43	C–1	38.08(t)	38.09(t)
1–H_e	1.78	1.78	C–2	68.10(d)	68.33(d)
2–H_a	3.83(ddd, 12.3, 3)	3.83(m, $W_{1/2}$, 22.3)	C–3	68.10(d)	68.23(d)
3–H_e	3.94(ddd, 3.3, 3)	3.94(m, $W_{1/2}$, 8.3)	C–4	32.45(t)	32.53(t)
4–H_a	1.65	1.65	C–5	51.41(d)	51.48(d)
4–H_e	1.75	1.75	C–6	203.36(s)	203.56(s)
5–H	2.38(dd, 12.5)	2.38(dd, 13.4)	C–7	121.61(d)	121.79(d)
7–H	5.81(d, 2.5)	5.85(d, 2.5)	C–8	165.53(s)	166.11(s)
9–H_a	3.14(m, $W_{1/2}$[1), 22)	3.09(m, $W_{1/2}$, 21)	C–9	34.63(d)	34.67(d)
11–H_a	1.65	1.65	C–10	38.76(s)	38.80(s)
11–H_e	1.78	1.78	C–11	21.20(t)	21.29(t)
12–H_a	2.10(ddd, 13, 13.5)	2.13(ddd, 13.1, 3.5)	C–12	31.49(t)	32.19(t)
12–H_e	1.7–1.8	1.85	C–13	47.70(s)	48.27(s)
15α–H	2.00	2.00	C–14	83.97(s)	84.42(s)
15β–H	1.53	1.55	C–15	32.03(t)	31.88(t)
16α–H	1.98[2)]	1.95	C–16	26.74(t)	21.61(t)
16β–H	1.48[2)]	1.75	C–17	48.28(d)	50.28(d)
17–H	2.01	2.39(m)	C–18	15.89(q)	17.99(q)
22–H	3.59(m, $W_{1/2}$, 16)	3.33(dd, 11.2)	C–19	24.55(q)	24.55(q)
23α–H	1.30	1.30	C–20	43.04(d)	77.09(s)
23β–H	1.60	1.65	C–21	13.74(q)	21.77(q)
24α–H	1.75	1.75	C–22	74.07(d)	77.75(d)
24β–H	1.45	1.45	C–23	25.69(t)	27.59(t)
18–Me	0.73(s)	0.89(s)	C–24	42.55(t)	42.64(t)
19–Me	0.97(s)	0.96(s)	C–25	69.80(s)	69.86(s)
21–Me	0.95(d, 7.5)	1.18(s)	C–26	30.09(q)	30.10(q)
26–Me	1.19(s)	1.19(s)	C–27	30.01(q)	30.15(q)
27–Me	1.20(s)	1.20(s)			

来源：Girault Lafont.

1) 半峰宽，Hz。

2) 化学位移值可以互换。

第三节　保幼激素

一、保幼激素的分离和结构

保幼激素(juvenile hormone,JH)的作用,顾名思义主要是抑制变态以维持幼虫的形态。昆虫变态过程不仅通过变态激素(MH)来调控,更主要的原因是因为在此过程中保幼激素的缺失。保幼激素还有许多其他作用,如控制间歇期、卵蛋白的合成(蛋黄素,vitellin)、卵巢的发育、蝗虫和蚜虫的发育期、决定蜜蜂中从蜂后到工蜂的各个等级、控制信息素的产生及对其的反应等[20,21]。保幼激素在昆虫体内的含量极低, Rö ller 等获得 300μg 纯粹的 JH[22,23],质谱分析得分子式为$C_{18}H_{30}O_3$;用 200μg 测定^{1}H-NMR 谱;结合微量化学衍生化,最后确定出其化学结构,包括双键构型,但环氧基的构型未定。分子中包括甲酯部分一共有 18 个碳,称为 C_{18}-JH,又称 JH-Ⅰ(**3**)。不久又从中分得含量更低的 C_{17}-JH[24],或称 JH-Ⅱ(**4**)。

3　　**4**

从原始的昆虫到进化程度较高的昆虫,JH 的结构变异很少。除了 JH-Ⅰ和 JH-Ⅱ外,还有 JH-Ⅲ(**5**)[25]、JH-0(**6**)[26]、JHB$_3$(JH-Ⅲ,**7**)[27]及 4-methyl-JH-Ⅰ(**8**)[28]等。

5　　**6**

7　　**8**

在 JH-Ⅰ结构确定之前,匈牙利的 Sláma 研究欧洲无翅红蝽(*Pyrrhocoris apteru*)的 JH。在布拉格做实验时可以变成成虫,而在美国做实验时却变成超龄幼虫。究其原因,发现是美国产的滤纸中某种物质所引起,称为纸张因素(paper factor)[29,30]。这个纸张因素证明是滤纸原料为加拿大香胶冷杉(*Abies balsamea*)中的保幼酮(juvabione,**9**)[31];以后又得到另一个具有保幼激素活性的脱氢保幼酮

(dehydrojuvabione,**10**)[32]。保幼生物酮的类似物**11**等还存在于枞、铁杉、紫杉、落叶松、云杉等植物中[33]。

9　　**10**　　**11**

表7-2给出几个保幼激素的^{1}H-NMR、^{13}C-NMR数据。

表7-2　一些保幼激素(JH)的^{1}H-NMR和^{13}C-NMR化学位移值 δ(ppm,以TMS为内标)

碳原子	^{1}H JH-Ⅰ 400 MHz	^{1}H JH-Ⅱ 250 MHz	^{1}H JH-Ⅲ 400 MHz	^{13}C JH-Ⅰ (未注明)	^{13}C JH-Ⅱ (未注明)	^{13}C JH-Ⅲ 25 MHz	^{13}C JH B_3 (未注明)
O-Me	3.61(s)	3.68(s)	3.70(s)	50.75	50.72	50.75	50.87
1	—	—	—	167.14	167.20	167.20	167.01
2	5.57(br)	5.67(m)	—	115.31	115.31	115.34	115.64
3	—	—	—	159.83	159.89	159.86	158.84
4	—	—	—	41.19	40.78	40.83	37.57[1)]
5	—	—	—	33.29	36.51	36.33	35.54[1)]
6	5.05(br t, 6.4)	5.14(m)	5.22(m)	122.91	123.44	123.50	63.95[2)]
7	—	—	—	141.28	135.38	135.32	58.31[3)]
8	—	—	—	27.26[1)]	27.03[1)]	27.47[1)]	26.65[1)]
9	—	—	—	23.17	16.03	16.03	24.71[1)]
10	2.50(dd, 7.3, 5.1)	2.70(dd, 6.7, 5.7)	2.70(t, 6)	61.78	61.72	58.27	62.83[2)]
11	—	—	C-12	64.65	64.53	64.09	60.56[3)]
12	—	—	1.27(s)	21.59	21.59	18.75	18.76[4)]
13	0.98(t, 7.8)	1.00(t, 7.5)	xxx	9.65	9.50	xxx	xxx
3-Me	2.13(d, 1.2)	2.17(d, 1.3)	2.18(d, 1.3)	25.80[1)]	25.80[1)]	24.86[1)]	24.79
7-Et CH$_3$-	0.98(t, 7.8)	xxx	xxx	13.10	xxx	xxx	xxx
7-Et -CH$_2$-	—	—	—	25.57[1)]	xxx	xxx	xxx
7-Me	xxx	1.62(s)	1.63(s)	—	25.92[1)]	25.95[1)]	18.63[4)]
11-Me	1.16(s)	1.27(s)	1.32(s)	18.84	18.78	18.81	16.42[4)]

注:偶合常数 J, Hz。

xxx代表该原子的信号未出现。

1)、2)、3)、4)在同一化合物中标有相同上标数字的原子的化学位移值未能识别且可以互换。

二、保幼激素的合成与绝对构型确定

Mayer 等用 1.37mg 的 JH 混合物[90.2%(摩尔分数)JH–Ⅰ及 9.8%(摩尔分数)JH–Ⅱ]测旋光,由于样品量少,无法用钠光(589nm)测得,于是用较短波长的光(365nm,436nm,546nm 及 578nm)测定,再用外插法求出$[\alpha]_D$ 为 + 7°($[M]_D$ + 21°)[34]。他们认为 JH–Ⅰ与 JH–Ⅱ的差别仅在于 7–位是乙基或是甲基,后者离不对称中心较远,不会改变旋光符号,即二者均为右旋。把根据原子折射求旋光度的 Brewster 经验规则运用于环氧基,大胆假设其绝对构型为 10*R*, 11*S*。JH–Ⅰ的全合成证实了它的立体化学[35, 36]。

中西香尔等用 CD 方法决定了 JH–Ⅱ(**4**)的绝对构型[37]。先将环氧基打开生成邻二醇,在正己烷中加化学位移试剂 $Pr(dpm)_3$,在 312nm 波长时测得 $\Delta\varepsilon = -1.1$,从而证明其绝对构型为 10*R*, 11*S*。

三、抗保幼激素

Bowers 认为保幼酮(**9**)可能是植物对于害虫防卫分泌的一部分。合成结构简单而保幼活性更高的化合物,可用于杀虫,而如果能找到抗保幼激素(anti–juvenile hormone),也许对植物保护是更为有效的策略。他从菊科观赏植物熊耳草(*Ageratum houstonianum*)中分离得到两种具有抗保幼激素活性的早熟烯–1(prococene–1,**12**)和早熟烯–2(prococene–2,**13**)[38],它们也存在于其他藿香属植物中,属于甲氧基色烯类化合物,可由 6–甲氧基香豆素合成[39]。将它们用于红蝽幼虫,可使之早熟,变态为成虫,而早熟的昆虫无繁殖能力,但这方面的研究不多。

早熟烯可抑制昆虫腺体合成保幼激素,早熟烯苯并吡喃环上的双键可被对位甲氧基所活化,在保幼激素合成最后阶段,通过细胞色素 P450 多功能氧化酶进行环氧化与其永久性结合而使保幼激素失活[40]。乙酰色烯类化合物(**14**),由于不能被 P450 环氧化而不表现出抗保幼激素活性。

MeO　O　**12**　　MeO MeO　O　**13**　　O MeO　O　**14**

第四节　昆虫信息素

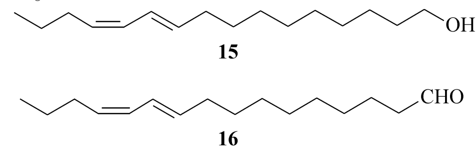
一、分离与结构测定

大多数信号化合物的含量都很微,从复杂的多组分挥发性混合物中分离鉴定

这些成分对有装备精良实验室的研究者来说也是极大的挑战,因而出现了一些研究昆虫信息素的组合技术[41,42]。除常规方法外,固相微量提取技术(solid-phase micro extraction,SPME)[43],是收集信号化合物极有效的方法[44~46]。由于不是所有的昆虫分泌物都具有生物活性,GC 在线连接分离技术结合电极图解方法(electroantennographic method)极大地促进了对确实能为受体昆虫(receiver)所感知的化合物的检测[47]。

现代 NMR 技术提供了最重要的结构信息数据;然而,在昆虫信息素结构鉴定中有一定局限性,原因是:①即使采用现代仪器,其灵敏度也相对较低(~ 1μg 测定 ^{1}H-NMR、10~ 15μg 测定 C-H 相关谱);②NMR 分析所需样品的分离过程既困难又费时,通常涉及大批量的昆虫个体。与此相反, GC-MS、GC-FT-IR 等在线方法,以及与质谱串联的二维气相色谱技术(GC-GC,MS-MS),具有分离的高选择性和检测的高灵敏度[仅需纳克(ng)或皮克(pg)量]的优点,而其局限性是质谱数据专一性较差,所推断的结构需要化学合成来证实。一些衍生化反应,特别是微量反应技术,研究衍生物的质谱裂解规律,对阐明结构特别有效[48~50]。

诺贝尔奖获得者德国的 Butenandt 等经过 20 年的不懈努力,于 1959 年发表了从 50 万头雌性处女蚕蛾(silkworm moth)*Bombyx mori* 中分离出 12mg 性信息素蚕蛾醇(bombykol,**15**)[51],确定其化学结构为反-10-顺-12-十六碳烯-1-醇[52],它是第一个被发现的昆虫信息素,10~ 12μg 量即可使雄性蚕蛾兴奋。它常与蚕蛾醛(bombykal,**16**)相混。



Arn 等罗列了 **1500** 多种昆虫中已鉴定的昆虫性信息素[53]。昆虫中性信息素含量少,可取量甚微,如研究最多的鳞翅目(Lepidopteran)昆虫,性信息素通常每头雌虫在纳克量水平,鞘翅目聚集信息素的量稍多些,每头虫也仅含亚微克水平,分离一定的量供结构研究十分困难,这就大大阻碍了早期对信息素的化学及应用研究的展开。随着科学技术的发展,各种微量分析技术及物理仪器的进步,大大推动了昆虫信息素的深入研究,现已能用极微量的样品来测定结构。目前对于大多数鳞翅目性信息素这种简单分子结构鉴定,所需虫量已由以前的上万头减少到数千头以至数头,分析周期也相应缩短。鞘翅目聚集信息素多数是具有光学活性的萜类。如美洲大蠊(*Periplameta americana*)的信息素(**17**)结构较复杂,荷兰学者从 75 000 只处女昆虫只分得 20μg 纯品[54],根据 MS 及 ^{1}H-NMR 分析,并结合生源学说推出了结构。Still 等合成了其非对映异构体 **18**,**19**[55],并对产物进行了光学拆分[56],证明了(-)-periplanone B(**20**)的立体结构。

17 18 19 20

鳞翅目昆虫信息素可分为几个化学结构类型,其中大部分属于长链无支链的不饱和醇、醛、酮或乙酸酯,链长在 10~ 18 个碳之间,不饱和双键数最多可达三四个;其合成前体为硬脂酸(十八烷酸)和棕榈酸(十六烷酸)。最具代表性的化合物是顺-11-十四碳烯乙酸酯(**21**),它是 50 多种昆虫的性信息素,可吸引 100 多种雄性昆虫个体;有的昆虫不能立体专一性地合成信息素的某一种镜面体。种的特异性一般通过这些化合物的不同异构体,如区域异构体(positional isomer)以及几何异构体(geometrical isomer)的特定配比的混合物来实现。例如,粉红螟蛉蛾(*Pectinophor agossypiella*)中的性信息素是几何异构体顺-7-顺-11-十六碳二烯乙酸酯(**22a**)及顺-7-反-11-十六碳二烯乙酸酯(**22b**)的比例为 65 ∶ 35 的混合物[57]。

21 23

22a 22b

由于动物进化,信息素逐步由单一成分发展成为多种成分,以便传递更多信息。1966 年,Silverstein 发现齿小蠹(*Ips paracom fusus*)的集合信息素中含三种成分:小蠹二烯醇(ipsdienol,**24**)、小蠹烯醇(ipsenol,**25**)及(*S*)-顺马鞭烯醇[(*S*)-*cis*-verbenol,**26**]。野外试验表明单体的作用很弱。

24 25 26

除上述的直链脂肪族昆虫信息素外,一些支链脂肪族、甾体、萜类、高萜类(homoterpene)以及从丙酸酯 C_3 单元(propanoate)衍生的一些化合物也都可作为昆虫信息素。

二、昆虫信息素光学纯度测定

昆虫信息素含量极低,用一般方法难以测定其光学活性;立体选择性合成昆虫

信息素,也需要测定其光学纯度。

Silverstein 报道了一种超微量光学纯度测定方法[58,59]。如果信息素是醇,只要 50~200μg 样品,将它转变成(*R*)-(+)或(*S*)-(-)-α-甲氧基-α-三氟甲基苯基乙酸(α-methoxy-α-trifluoro-methylphenyl acetic acid, MTPA)酯。然后测定其 ^{1}H-NMR 谱,即可决定其光学纯度,也可用毛细管气相色谱将酯分离而定量。

三、信息素立体化学与生物活性的关系

有的昆虫对性信息素的立体化学要求专一,有的信息素对映体有增效作用,有的有抑制作用,而有的昆虫对它的手性信息素的立体化学要求不严格;信息素的活性与立体异构之间大致可归纳为如下四种关系:

1) 有的昆虫信息素受体能识别光学异构体,无活性的镜面体不阻碍活性镜面体的信息素作用。例如,德州切叶蚁(*Atta texana*)的告警信息素为(*S*)-(+)-4-甲基-3-庚酮(**27**)[60]。又如,Cross 分出肾斑皮蠹(*Trogoderma inclusum*)及皮蠹(*T. variable*)雌虫分泌的信息素为(*R*, *Z*)-14-甲基十六烯-8-醇[(*R*, *Z*)-14-methyl-hexadec-8-enol,**28**]及 *S*-体(**29**)[61]。Mori 等合成了二者[62],活性试验证明(*R*)-(-)-体的活性比(*S*)-(+)-体高 250 倍。

2) 有的昆虫信息素,没有活性的镜面体阻碍活性镜面体的作用。例如,雌性的盗毒蛾(*Porthetria dispar*)只在无(7*S*,8*R*)-(-)disparulure(**30**)时,对纯的性信息素(7*R*,8*S*)-(+)-disparlure(**30**)起反应[63~65],粗齿小蠹(*Ips calligraphu*)对它的集合信息素 **24** 及 **25** 的反应受(*R*)-顺马鞭烯醇的抑制[66]。日本弧(*Popilla japonica*)雌性性信息素为(*R*, *Z*)-**31**。Tumlinson 等合成了消旋的 *Z*-异构体,但无活性,又分别合成了 *R*, *Z*-异构体及 *S*, *Z*-体。生物试验表明 *R*, *Z*-体与天然产物具有相同的活性,而少量的 *S*, *Z*-体强烈抑制雄虫反应[67]。

3) 有的信息素两种光学异构体均有活性。如(1*R*,2*S*)-(+)-grandisol(**32**)为雄性墨西哥棉铃象(*Anthonomus grandis*)的 4 个性信息素之一。但合成的对映体(-)-grandisol(**33**)具有与(+)-体相同的生理活性[68]。

有的同属不同种的昆虫对不同镜面体产生反应,如甲虫(*Ips paraconfusu*)对(*S*)-(+)-小蠹二烯醇(**24**)起反应,而 *I. calligraphus* 对(*R*)-(-)-体起反应。

4) 还有的信息素,两种镜面体同时存在时,活性大大增强,即有协同作用。如甲虫棘径小蠹(*Gnathotrichus sulcatus*)的集合信息素为(*S*)-(+)-与(*R*)-(-)-sulcatol(**23**)的 65 ∶ 35 混合物。后来发现消旋体的活性比天然产物更强,而 *S*-体或 *R*-体的活性最弱。说明该昆虫有两种体,必须 *R*-*S* 信息素同时与昆虫体结合才产生强烈的生理作用。

27　　28

29　　(+)-disparlure 30

31　　(+)-grandisol 32　　(−)-grandisol 33

四、昆虫信息素的合成

昆虫对于信息素的立体化学(这包括对几何异构及光学纯度)要求甚高,因此在过去的10余年中已有许多合成研究工作报道。现在对于合成高纯度顺、反式几何异构体的方法已日臻完备,人们已把兴趣转到对于光学活性的信息素的合成方面。如果合成的目的是为了进行生物试验,则要求反应立体专一性非常高,并在合成过程中要避免异构化;否则,混入少量异构体,就得不到明确的生物活性结论。

(一) 几何异构体的合成

1. (*Z*)-双烯锂铜

二烷基铜锂可以定量地立体专一性地加到乙炔上,生成*Z*-双烯锂铜(R_2CuLi),纯度大于99.9%[69]。运用这个反应合成了葡萄果蠹(*Eupoecilla ambiguella*)的性信息素(**34**)。由于1%的*E*-异构体即会完全抑制其生物活性,要求反应的立体专一性非常高。反应式如下:

$\frac{1}{2}(R\text{-CH=CH})_2CuLi$ → 1) 1eq① HMPA,THF; 2) $I(CH_2)_8OAc$; 3) 1.5eq $P(OEt)_3$; 4) H_3O^+ → OAc

34 (81%, *Z*=99.9%)

① eq(当量)为非法定单位,根据国家规定,当量应改用物质的量表示。但由于实际应用中仍广泛使用当量的概念,加上在有些情况下,当量与物质的量不等值,因此本书仍保留当量一词的使用,在此特做说明。

2. 炔键移位及有机硼反应

(7*E*, 9*Z*)–7,9–十二碳二烯–1–醇乙酸酯(**35**)为花翅小卷蛾(*European grape-vinemoth*, *Lobesia botrana*)的性信息素,Negishi 的合成路线如下[70]:

36 —($C_2H_5C≡CLi$)→ **37** —(1) I_2；2) NaOAc；3) H_2O_2,NaOAc)→ **38** —(1) -*iso*-$(pentan)_2BH$；2) HOAc；3) H_2O_2,NaOAc)→ **35**

3. 1–甲基–(1*Z*,5*Z*)–环庚二烯

1–甲基–(1*Z*,5*Z*)–环庚二烯选择性地氧化三取代双键,得率为 85%。用此法[71]已合成了粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)性信息素、草地夜蛾(*Spodoptera jrugiperda*)性信息素和旋幽夜蛾(*Scogogramma trifoli*)性信息素。

4. 丙烯醇次磺酸酯重排成亚砜反应的应用[72]

Babler 等合成了苏丹棉铃虫(*Diparopsis castanea*)的性信息素。关键的一步运用了 Reich 发现的方法[73]。

5. 格氏试剂与 1–烃炔–2–丙烯基乙酸酯的偶合反应[74, 75]

在亚铜离子存在下,1–烃炔–2–丙烯基乙酸酯(1–alkynyl–2–propenyl acetate)与格氏试剂反应生成共轭的 *Z*–烯炔,得率 80%[102]。

(二) 对映异构体的合成

对映异构体的合成一般有三个途径:①用已知绝对构型的光学纯的化合物为原料进行立体专一性合成,如 α–氨基酸、羟基酸、萜类和碳水化合物等[76];②对映异构体的拆分[77, 78];③化学或生物化学不对称合成[5]。

(三) 我国昆虫信息素合成研究现状

20 世纪 70 年代中后期,中国的有机化学家对当时国际热门领域,即昆虫信息素的合成开展了跟踪而有创造性的研究工作。前后合成了一大批昆虫(棉红铃虫[79]等)信息素。上海有机化学研究所的昆虫信息素小组在 20 世纪 80 年代则着

重一些具手性的信息素的不对称合成[80~82]，林国强继续致力于昆虫性信息素[如松干蚧性信息素(sex pheromone of *Matsucoccus pine* bast scale)]所有4个可能的光活性异构体[83]的手性合成；贺菊芳等从β-紫罗兰酮出发合成昆虫拒食剂(warburganal)和其系列的倍半萜化合物[84, 85]；李焰等[86]用(2*R*)-莰烷磺内酰法合成了红褐林蚁(*Formica rufa*)和多点林蚁(*Formica polyctena*)昆虫信息素的主要组分——3-乙基-4-甲基戊酸甲酯。

国槐尺蠖(*Macaria elongaria* Leech)是危害我国北方重要树种国槐的主要害虫，其信息素的活性成分被李正名等[87]于1988年确定，为非共轭直链二烯或多烯类，龚考才等[88]完成了其中两个主要组分的全合成。

昆虫信息素化学是迅速发展的领域之一，应重视其研究开发。昆虫信息素研究战略已转向多学科交叉，重点是对于信息素体内的生物合成、释放控制因子和感受机理的深入研究以及难度更高更微量的信息素的结构鉴定、光学活性物质的合成等。

参 考 文 献

[1] Hick A et al. Nat Prod Rep, 1999, 16:39
[2] Mori K. Tetrahedron, 1989, 45:3233
[3] Shani A. Drug Development Research, 2000, 50:400
[4] Harborne J B et al. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Oxford: Oxford University Press, 1991,331
[5] Wighley S et al. Phytochemical Diversity a Source of New Industrial Products. The Royal Society of Chemistry. Cambridge: OxInformation Services, 1997,220
[6] Barton D H et al. Comprehensive Natural Products Chemistry. New York:Elsevier, 1999, 8:197, 263
[7] 杜家纬. 植物生理学报, 2001, 27:193
[8] 石奇光. 昆虫信息素防治害虫技术. 上海:上海科学技术出版社, 1987:3
[9] Butenandt A et al. Z Naturforsh, 1954, 96:389
[10] Huber R et al. Chem Ber, 1965, 98:2403
[11] Nakanishi K et al. Chem Commoun, 1966:915
[12] U S Patent, 1967, 87:325
[13] U S Patent, 1978, 36:134
[14] Jacobson M et al. Natural Occurring Insecticides. New York: Marcel Dekker, 1971,333
[15] Kerkut G A et al. Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985
[16] U S Patent, 1972, 10:138
[17] Morgan E D et al. Handbook of Natural Pesticides. Boca Raton:CRC Press, 1987, 3, Part A:15

[18] Harada N et al. J Am Chem Soc, 1969, 91:3989
[19] Kooreda M et al. J Chem Soc, Chem Commun, 1969, 542
[20] Nijhout H F. Insect Hormones. Princeton:Princeton University Press, 1994
[21] Morgan E D et al. Handbook of Natural Pesticides. Boca Raton:CRC Press, 1987, 3, Part A:87
[22] Röller H et al. Angew Chem. Int Ed Engl, 1967, 6:179
[23] Dahm K H et al. J Am Chem Soc, 1967, 89:5292
[24] Mayer A S et al. Proc Nat Acad Sic USA, 1968, 60:853
[25] Bergot B J et al. Proc Nat Acad Sic USA, 1973, 70:1509
[26] Bergot B J et al. Science, 1980, 210:336
[27] Liu M A et al. Physiol Entomol, 1988,13:69
[28] Bergot H F et al. Juvenile Hormone Biochemistry:Action, Agonism and Antagonism. Amsterdam:Elsevier, 1981
[29] Sláma K et al. Proc Nat Acad Sic USA, 1965, 54:411
[30] Sláma K et al. Biol Bull, 1966,130:235
[31] Bowers W S et al. Science, 1966, 154:1020
[32] Cerný V et al. Tetrahedron Lett, 1967, 8:1053
[33] Manville J F et al. Coll Czech Chem Commun, 1977, 42:3658
[34] Meyer A S et al. Biochem Biophys Res Commun, 1970, 41:891
[35] Faulkner K J et al. J Am Chem Soc, 1971, 93:3766
[36] Johnson W S et al. J Am Chem Soc, 1970, 93:4463
[37] Naknishi K et al. J Chem Soc, Chem Commun, 1971,1235
[38] Bowers W S et al. Science, 1976, 193:542
[39] Livingstone R et al. J Chem Soc, 1957,1509
[40] Brooks G T et al. Nature, 1979, 281:570
[41] Hummel H E et al. Techniques in Pheromone Research. New York:Springer, 1984
[42] Acree T E et al. Semiochemistry, Flavours and Pheromones. Berlin:de Gruyter, 1985
[43] Pawhszyn J et al. Solid Phase Micro Extraction, Theory and Practice. New York: Wiley VCH, 1997
[44] Malosse C et al. J High Resolut Chromatogr, 1995, 18:669
[45] Maier I et al. Naturwissenschaften, 1996, 83:378
[46] Borg Karlson A K et al. Z Naturforsch Teil C, 1996, 51:599
[47] Arn H et al. Z Naturforsch Teil C, 1975, 30:722
[48] Attygalle A B et al. Angew Chem, 1988, 100:475
[49] Attygalle A B et al. Angew Chem, Int Ed Engl, 1988, 27:460
[50] Millar J G et al. Methods in Chemical Ecology. New York:Chapman & Hall, 1988
[51] Butenandt A et al. Z Naturforsch, 1959, 14B:283
[52] Butenandt A et al. Angew Chem, 1961, 73:349

[53] Arn H et al. List of Sex Pheromones of *Lepidoptera* and Related Attractants. Wädenswil, International Orgnization for Biological Control. West Palearctic Regional Section, 2nd ed. 1992
[54] Persoons C J et al. Tetrahedron Lett, 1976, 17:2055
[55] Still W C et al. J Am Chem Soc, 1979, 101:2493
[56] Adams M A et al. J Am Chem Soc, 1979, 101:2495
[57] Linn C E et al. J Chem Ecol, 1985, 11:1583
[58] Silverstein R H et al. J Chem Ecol, 1976, 2:307
[59] Silverstein R H et al. J Chem Ecol, 1977, 3:27
[60] Riley R G et al. Science, 1974, 183:760
[61] Cross J H et al. J Chem Ecol, 1976, 2:457
[62] Mori K et al. Tetrahedron, 1978, 34:3119
[63] Iwaki S et al. J Am Chem Soc, 1974, 96:7842
[64] Vité J P et al. Naturwissenschaften, 1976,63:582
[65] Miller J R et al. J Insect Physiol, 1978, 23:1447
[66] Harring C M et al. Z Angew Entomol, 1977, 82:327
[67] Tumlinson J H et al. Science, 1977, 197:789
[68] Mori K et al. Naturwissenschaften, 1978, 65:653
[69] Cahiez G et al. Tetrahedron Lett, 1980, 21:1433
[70] Negeshi E et al. Tetrahedron Lett, 1977, 18:411
[71] Odinokov B N et al. Zh Org Khim, 1979, 15:1403
[72] Babler J H et al. J Org Chem, 1979, 44:3723
[73] Reich H J et al. J Am Chem Soc, 1978, 100:5981
[74] Cassani G et al. Tetrahedron Lett, 1979, 20:633
[75] Cassani G et al. Tetrahedron Lett, 1980, 21:3497
[76] Heath R R et al. J Org Chem, 1980, 45:2910
[77] Pirkle W H et al. J Org Chem, 1979, 44:1025
[78] Pirkle W H et al. J Org Chem, 1977, 42:2781
[79] 仲同生等. 化学学报, 1982, 40:856
[80] 林国强等. 化学学报, 1984, 42:74
[81] 林国强等. 化学学报, 1985, 43:257
[82] Lin G Q et al. Pure & Appl Chem, 1993, 65:1233
[83] Lin G Q et al. Tetrahedron Lett, 1993, 34:5931
[84] 贺菊芳等. 科学通报, 1989, 4:32
[85] He J F et al. Tetrahedron, 1988, 29:4039
[86] 李焰等. 化学学报, 2001, 59:763
[87] Li Z M et al. Proceeding of China-Japan Seminar on Isect Semiochemicals. Beijing, 1988,29
[88] 龚考才等. 泸州医学院学报, 2000, 23:6

第八章　二萜类化合物

二萜类(diterpenoids)化合物是具有 20 个碳为骨架的碳、氢化合物,通常可以用$(C_5H_8)_4$为通式表示。二萜类化合物广泛地分布在自然界中,包括植物、动物、海洋生物等。近年来,不断发现新的二萜化合物的骨架,根据 *The Combined Chemical Dictionary* 的记载,共有 119 种骨架,化合物近 10 000 个之多。但是,主要的二萜基本骨架还是我们常见的几种。例如,已发现的克罗烷(cleordane)、贝壳杉烷(kaurane)、半日花烷(labdane)和松香烷(abietane)均在千个以上;紫杉烷(taxane)和 abeo 紫杉烷(abeotaxane)也发现了 400 多个[1]。

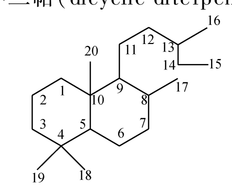
第一节　常见的二萜类化合物的骨架

常见的二萜类化合物的骨架如下:

(1) 无环和单环二萜(acyclic and mono-cyclic diterpene)

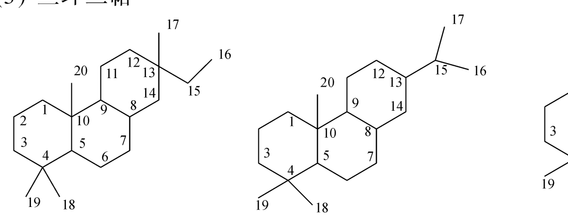
植醇(phytol)　　维生素 A(vitamine A)

(2) 二环二萜(dicyclic diterpene)

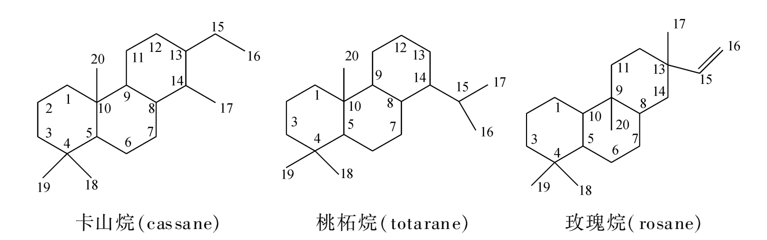


半日花烷(labdane)　　克罗烷(clerodane)

(3) 三环二萜

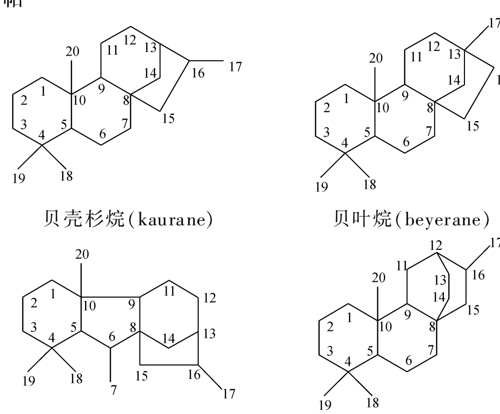


海松烷(pimarane)　　松香烷(abietane)　　罗汉松烷(podocarpane)



卡山烷(cassane)　　桃柘烷(totarane)　　玫瑰烷(rosane)

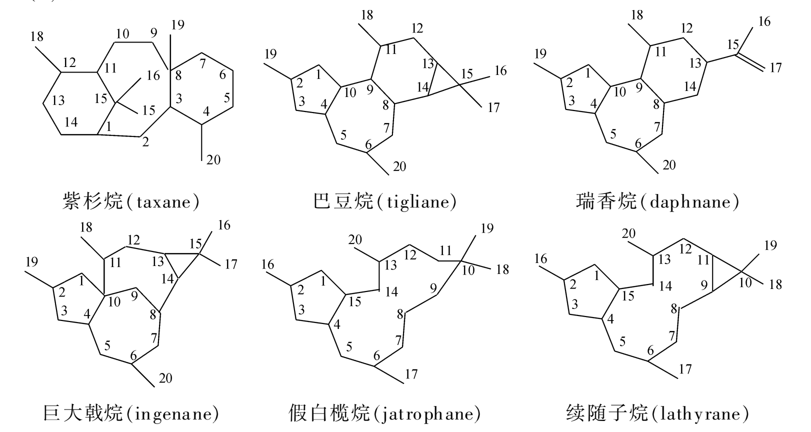
(4) 四环二萜



贝壳杉烷(kaurane)　　贝叶烷(beyerane)

赤霉烷(gibberellane)　　阿替生烷(atisane)

(5) 大环二萜

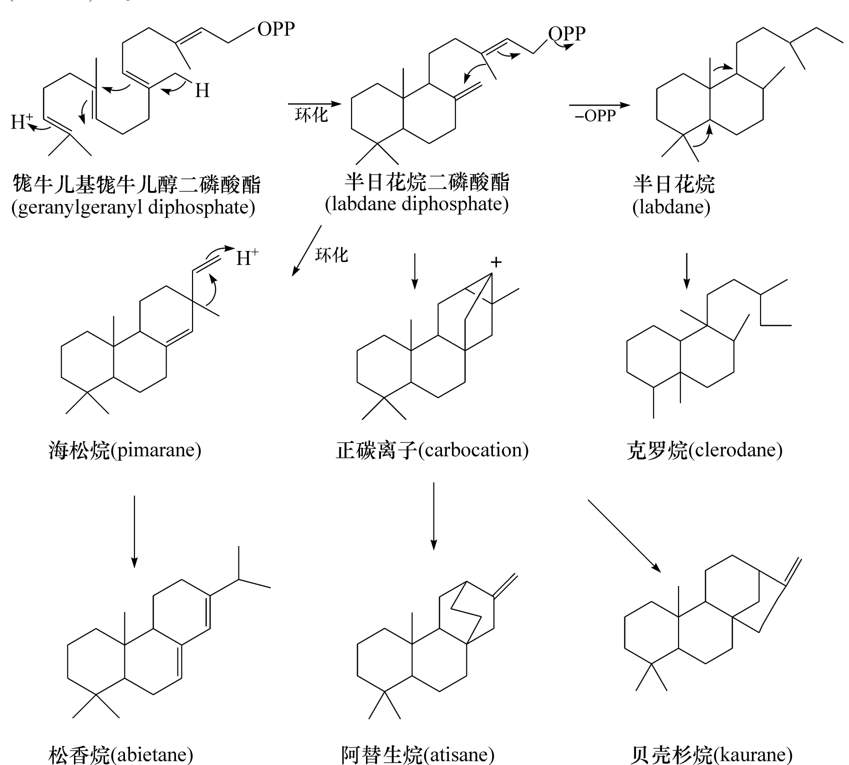


紫杉烷(taxane)　　巴豆烷(tigliane)　　瑞香烷(daphnane)

巨大戟烷(ingenane)　　假白榄烷(jatrophane)　　续随子烷(lathyrane)

第二节　生 源 关 系

二萜类化合物至今认为始源于牻牛儿基牻牛儿醇二磷酸酯(geranylgeranyl diphosphate)的环合,环合最初生成半日花烷二磷酸酯(labdane diphosphate),脱去二磷酸酯,生成二环二萜半日花烷(labdane)。半日花烷发生键的转移生成克罗烷(clerodane)。半日花烷二磷酸酯进行第二次环合,生成三环二萜海松烷(pimarane),海松烷经重排产生松香烷(abietane)。从半日花烷二磷酸酯生成一种非经典的正碳离子(carbocation),然后形成四环二萜,如贝壳杉烷(kaurane)、阿替生烷(atisane)[2]。



大环二萜也是经牻牛儿基牻牛儿醇二磷酸酯环合而成的。例如,西松烯(casbene)和假白榄烷(jatrophane)的生源关系可表示如下:

牻牛儿基牻牛儿醇二磷酸酯
(geranylgeranyl diphosphate)

西松烷(cembrane)

西松烯(casbene)　　假白榄烷(jatrophane)

第三节　二萜类化合物的分离

二萜类化合物在自然界分布较广,比较集中的有唇形科(Labiatae)、马鞭草科(Verbenaceae)、卫矛科(Celastraceae)、大戟科(Euphorbiaceae)、瑞香科(Thymelaeaceae)、杜鹃花属(*Rhododendron*)、红豆杉属(*Taxus*)等。动物和海洋生物也存在有许多二萜类化合物。由于现代谱学的发展,二萜类化合物的研究突飞猛进,进展迅速,许多复杂的结构都能够得到确定。更重要的是对它们的生理活性的深入研究,发现二萜类化合物对人类某些重大疾病有很好的治疗效果,如发现紫杉醇(taxol)具有抗癌活性,紫杉醇对治疗卵巢癌、肺癌,有很好的效果,紫杉醇已成为当今抗癌药物中的主要药物之一。将二萜类化合物应用于医药的研究还仅仅是开始,估计还有许多二萜类化合物的活性尚未发现,更待探索,所以二萜类化合物是很有前景的一类化合物。

二萜类化合物的骨架可以通过脱氢反应加以证明。例如,二环二萜脱氢后生成萘的衍生物;三环二萜生成菲的衍生物。也可以通过氧化加以证明。例如,紫杉醇用过碘酸氧化后,大环破裂,根据分析产物了解到它是由6/7/6三个环稠合而成。上述化学反应是确定骨架的重要手段。随着波谱的发展,利用HMBC、HMQC、TOCSY等图谱可以将化合物的碳和氢一一归属,确定其骨架。应用X射线衍射也是确定骨架的好办法。除骨架外,还可以利用NOESY或CD谱来确定基团的构型。此外,确定骨架的构象也是很重要的。

我们在日常的研究中,要确定化合物是否属于二萜类化合物,常感到有些困难,这是因为二萜类化合物没有特殊反应作为鉴别途径。硫酸反应、硫酸香荚醛反应是我们常用的方法。为了鉴别二萜化合物,一般可以用Lieberman反应(浓硫酸-乙酸

酐)将三萜和甾体加以排除,排除后的化合物是否为二萜、倍半萜或单萜,则可以利用碳谱加以区别。至于是什么骨架的二萜,那就需要利用更多的谱学和其他方法予以确定了。

二萜类化合物的分离一般都可以利用它们在氯仿、二氯甲烷中易溶的特点,将它们富集起来,氧化程度高的二萜和大环二萜在乙酸乙酯中的溶解性更好,要根据情况加以处理。利用硅胶柱和 Sephedax LH-20 可以得到好的分离。也可以用反相柱如 RP-C_{18}、RP-C_8,还可以利用 HPLC 和制备 TLC 加以分离和纯化。

二萜类化合物一般都显示细胞毒活性。毒性过强,对人损害过大而不能使用;毒性太小,活性不高。因此,如何找寻一个活性适中的二萜类化合物,或者对它们进行改造是一个值得深入研究的课题。

目前已经分离报道的二萜类化合物种类和数量极多,本章无法一一加以阐述。要想了解二萜类化合物的进展,可参阅杂志 *Natural Product Reports*,该杂志定期按年代连续地发表二萜类化合物的进展。

第四节　半日花烷

半日花烷始源于牻牛儿基牻牛儿醇二磷酸酯(**1**)的环合,环合从 C-17 甲基上的质子的电子云发生转移至$\Delta^{6,7}$,由$\Delta^{6,7}$上的电子转移至$\Delta^{10,11}$,再从$\Delta^{10,11}$上的电子向$\Delta^{14,15}$转移,环合生成了半日花烷二磷酸酯(**2**)。脱去二磷酸酯,生成二环二萜半日花烷。牻牛儿基牻牛儿醇二磷酸酯若为 **1** 式的构象,则$\Delta^{6,7}$上的电子从 C_{18}—Me的下面进行进攻,环合后,产生 C_{20}—Me 为β-构型,C_5—H 为α-构型,称为半日花烷(**2**)。若牻牛儿基牻牛儿醇二磷酸酯为 **3** 式构象,$\Delta^{6,7}$上的电子从 C_{18}—Me 的上面进行进攻,环合后,C_{20}—Me 为α 构型,C_5—H 为 β 构型,称为 *ent*-半日花烷(*ent*-labdane,**4**)[2]。

3

4　　　4

在二萜类化合物中,根据生源关系,认为二环、三环和四环二萜都是由半日花烷衍生出来的其他类型二萜,若 A/B 环为反式骈环,其 C_{20}—Me 均β-构型,C_5—H 为α-构型,一般就以该萜类名称命名,不加任何修辞。若从 *ent*-半日花烷衍生出来的其他类型的二萜,C_{20}—Me 均为α-构型,C_5—H 为β-构型,称 *ent*-型,在该萜类名称前冠以 *ent*-。

半日花烷和 *ent*-半日花烷型半日花烷二萜在自然界大量存在。从毛喉鞘蕊花(*Coleus forskohlii*)分离的鞘蕊花素(forskolin, **5**),从 *Marrubium vulgare* 分离的 marrubiin (**6**)从 *Grindelia integrifolia* 分离的 19-hydroxygrindelic acid (**7**)均属于半日花烷型二萜。从穿心莲(*Andrographis paniculata*)分离的穿心莲内酯 (andrographolide, **8**)和双穿心莲内酯 A (bisandrographolide A, **9**)属于 *ent*-半日花烷型二萜[3,4]。

5　　6　　7

8　　9

穿心莲内酯具有抗菌、消炎的功效，近年又发现有细胞分化诱导活性和抗中毒性肝损伤的活性[4]。

穿心莲内酯的^{1}H-NMR 和^{13}C-NMR 数据见图 8－1。

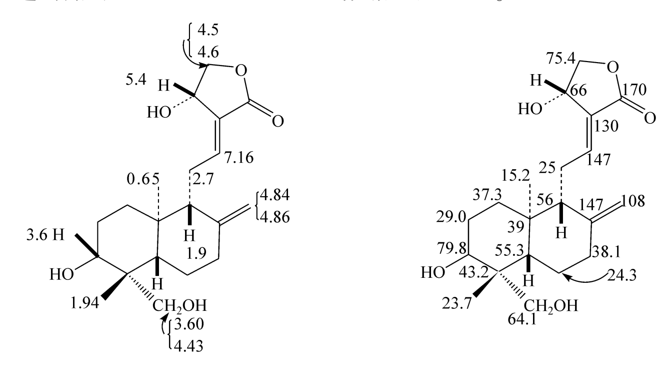


图 8－1　穿心莲内酯的^{1}H-NMR 和^{13}C-NMR 数据(py-d_5)

鞘蕊花素的^{1}H-NMR 和^{13}C-NMR 数据见图 8－2。

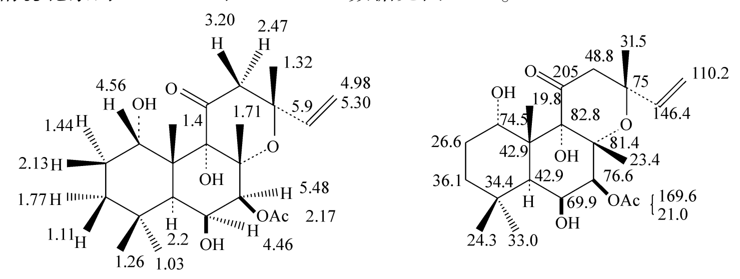


图 8－2　鞘蕊花素的^{1}H-NMR 和^{13}C-NMR 数据（$CDCl_3$）

第五节　克罗烷二萜

克罗烷二萜的名称起源于化合物 clerodin (**10**)，它的骨架用 **11** 和 **12** 表示。从其结构可知，克罗烷结构的骨架为十氢萘，它的结构中 C-4 和 C-5 各存在一个烷基，C-5 为一个甲基，C-10 无取代，C-9 有两个烷基取代为一季碳。构型与 clerodin (**10**)相同的母核命名为 neo-克罗烷(neo-clecodane, **11**)，构型与化合物(**10**)相反的为 *ent*-neo-克罗烷(*ent*-neo-clecodane, **12**)。

10

neo-克罗烷(neo-clerodane)

11

ent-neo-克罗烷
(*ent*-neo-clerodane)

12

克罗烷二萜多发现于唇形科(Labiatae)植物中,并显示良好的昆虫拒食活性。从金疮小草(*Ajuga decumben*)中分离出多种 neo-克罗烷二萜,如金疮小草素 A～G (ajugacumbins A～G,**13**～**19**)[5]。

13　R_1 = OAc, R_2 = R_3 = H

14　R_1 = OH, R_2 = R_3 = H

15　R_1 = R_2 = R_3 = OAc

16　R_1 = OAc, R_2 = H, R_3 = OH

17

18

19

从 *Teucrium Pernyi* 中分离得到在 C-18 和 C-19 间形成内酯的 neo-克罗烷 teupernin A (**20**)、teupernin B(**21**)和 teupernin C (**22**)[6]。

20　21　22

从 *Teucrium japonicum* 植物中,发现了 nor-neo-克罗烷二萜,如 teaponin (**23**)和 teupernin D(**24**)[7]。在 *T. Japonicum*、*T. chamaedrys* 等植物中发现了 teucvidin(**25**)、teucvin(**26**)和 teuflin(**27**)三种异构体。

23　24

25 H-10α,H-6α
26 H-10β,H-6β
27 H-10β,H-6α

从 *Scutellaria* 属植物中分离得到在 C-8 和 C-9 之间形成螺旋内酯的 neo-克罗烷,如化合物 **28**。像 clerodin(**10**)样类型的 neo-克罗烷二萜也不断从 *Ajuga* 和 *Scutellaria* 属植物中发现,如化合物 **29**,它们都具有昆虫拒食活性。许多克罗烷二萜都具有昆虫拒食活性[8]。

28

29

第六节 松香烷二萜

松香烷(abietane)二萜为三环二萜,它是从海松烷重排产生而来的。松香烷在C-13位存在一异丙基,C-4位存在一偕二甲基,C-20为一角甲基。重排反应为

海松烷 → 松香烷

天然界存在的松香烷二萜,由于其脱氢或氧化的程度不一样,在结构的不同部位发生各种重排,产生了多种松香烷二萜。

最简单的松香烷如松香酸(abietic acid, **30**)、C环被芳香化的铁锈醇(ferruginol, **31**)。

A环发生重排反应的松香烷二萜,如存在于卫矛科植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)中的二萜雷公藤内酯醇(雷公藤甲素,triptolide, **32**),其A环具有α,β-不饱和γ-内酯和在B环和C环上具有环氧的二萜,呈现很强的抗炎和免疫抑制的生理活性[9]。

属于C环重排的松香烷二萜,如从狼毒大戟(*Euphorbia fischeriana*)中分离出的jolkinolide A(**33**)和17-hydroxy-jolkinolide A(**34**)[10];从月腺大戟(*E. ebracteolata*)分离出的yuexiandajisu D (**35**)、E (**36**)和F(**37**)[11]。

化合物**30**、**31**、**32**为松香烷型,化合物**33**~**37**为*ent*-松香烷型二萜。

C环具有醌类结构的松香烷,存在于唇形科鼠尾属(*Salvia*)植物丹参(*Salvia*

miltorrhiza)中。所含丹参酮ⅡA(tanshinoneⅡA,**38**)的邻醌的结构,以及异丹参酮Ⅰ(isotanshinoneⅠ, **39**)为对醌的结构等。

30　**31**　**32**

33　**34**　**35**

36　**37**　**38**　**39**

松香烷的C环常被芳香化,有的同时还发生重排,如存在马鞍草科的海通(*Clerodendrum mandrainorun*)的多种二萜属于此类[12]。

从美丽红豆杉(*Taxus chinensis*)中分离的Abeo 9(10→20)松香烷二萜,命名为icetexane,已发现有40余种。美丽红豆杉A(taxamairin A,**40**)和美丽红豆杉B(taxamairin B,**40**)属于此类二萜,并对hepatoma细胞有抑制作用(taxamairin A, IC_{50}为30.21μg/mL; taxamairin B, IC_{50}为26.78μg/mL)[13]。

taxamairin A，　R = OH

taxamairin B，　R = OCH_3

40

化合物 **32** 和 **35** 的核磁共振数据分别见图 8－3 和图 8－4。

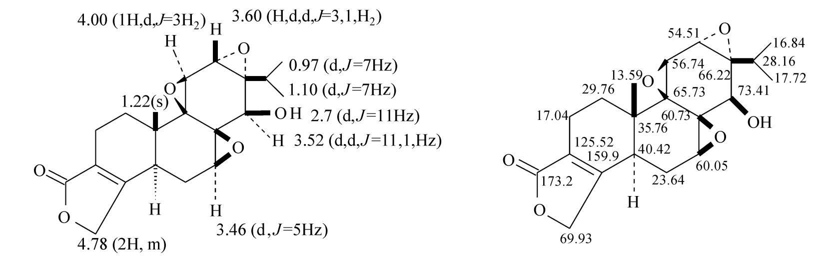


图 8－3　雷公藤内酯醇(**32**)的[1] H-NMR 和[13] C-NMR 数据(CDCl3)

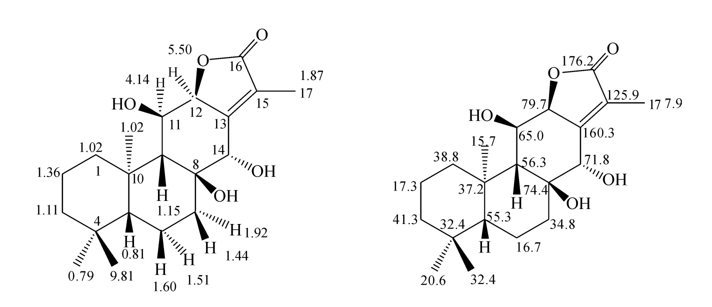


图 8－4　yuexiandajisu D (**35**)的[1] H-NMR 和[13] C-NMR 数据 (CDCl3)[11]

第七节　海松烷二萜

海松烷二萜为三环二萜，在松树流出的松脂中发现。海松烷的骨架由氢化菲(hydrophenanthrine) 组成，C-4 为偕二甲基，C-20 为角甲基，C-13 被一甲基和乙基或乙烯基(vinyl)所取代。海松烷是经半日花烷二磷酸酯(**2**)重排而生成的，其反应过程为

2　　　　　　海松烷

海松烷可分为海松烷(pimarane)和异海松烷(isopimarane)。C-13 位的甲基为α-构型,烯基为β-构型,称为海松烷;相反,C-13 位的甲基为β-构型,烯基为α-构型,称为异海松烷。海松烷和异海松烷又因 C_{20}-Me 基为β-构型,称为海松烷或异海松烷型。如果 C_{20}-Me 为α-构型,称为 *ent*-海松烷(*ent*-pimarane)或 *ent*-异海松烷(*ent*-isopimarane)型。

例如,海松酸(pimaric acid,**41**)为海松烷型、异海松酸(isopimaric acid,**42**)和 sandaracopimaric acid (**43**)均为异海松型;oryzalexins (**44**)为 *ent*-海松烷、化合物 **45** 和化合物 **46** 为 9-epi-*ent*-海松烷、化合物 **47** 为 *ent*-异海松烷[2,14]。海松烷的 ^{13}C-NMR 可参阅文献[15,16]。

41　　**42**　　**43**

44　　**45** R_1=CH_2OAc,R_2=Me　　**47**
46 R_1=Me,R_2=CH_2OH

第八节　卡山烷和桃柘烷二萜

1. 卡山烷

卡山烷(cassane)的母核同海松烷极为相似,相异于 C-13 位的甲基重排到

C-14,重排的过程为

海松烷 → 卡山烷

报道的卡山烷 A/B 环为反式骈环,C_{20}—Me 为β-构型,C_5—H 为α-构型,卡山酸(cassaic acid,**48**)就是这类型的二萜。具有呋喃环的呋喃卡山烷,如 ε-caesalpin (**49**) 和 α-caesalpin (**50**) 分离自 *Caesalpinia bonducella* 的种子,从 *Caesalpinia crista* 分离出去甲卡山烷(norcassane)、norcaesalpinin A(**51**) 和 norcaesalpinin B (**52**)[17,18]。卡山烷的^{13}C-NMR 可参阅文献[19]。

48　　**49**

50

51 R_1=OAc,R_2=H
52 R_1=H,R_2=OAc

2. 桃柘烷

桃柘烷(totarane)为 C-14 具有异丙基取代的三环二萜,C_{20}—Me 为β-构型,C_5—H为α-构型,C 环常被芳香化。以分离自 *Podocarpus totara* 的桃柘醇 (totarol, **53**)为代表。用分离自 *P. nagi* 的桃柘酮 (totarolone,**54**) 进行 Clemmensen 反应,得桃柘醇。桃柘酮的 CD 谱呈正 Cotton 效应,同 lanost-8-en-3-one 的 Cotton 效应相同,证明了桃柘烷 A/B 为反式和 C_{20}—Me 为β-构型,C_5—H 为α-构型。分离自 *P. nagi* 的 nalilactone C(**55**) 和分离自 *P. macrophyllus* 的 inunakilactone

A (**56**)也属于桃柘烷[20]。

53

54

55

56

第九节　玫瑰烷二萜

玫瑰烷(rosane)二萜为三环二萜,由海松烷的 C_{20}-甲基转移至 C-9 位,称为玫瑰烷。重排过程如下

pimarane　　rosane

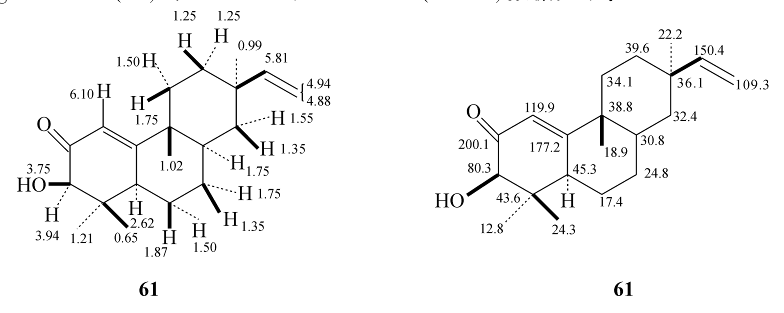
玫瑰烷的 C-20 (位于 C-9),若为β-构型,称为玫瑰烷型二萜;若为α-构型,称为 *ent*-玫瑰烷型二萜。例如,分离自 *Gackstroemia decipiens* 的 11β-hydroxy-ros-5,15-ene (**57**)、5β,11β-dihydroxy-ros-15-ene (**58**)为玫瑰烷型二萜。分离自 *Sagittaria sagittifolia* 的 *ent*-rosa-5,15-dien-19 α-oic-acid (**59**)和 5α-hydroxy-*ent*-rosa-15-en-19 β-oic acid (**60**)为 *ent*-玫瑰烷型二萜[22]①。

① 按照二萜命名的原则,若结构为 *ent* 型二萜,*ent* 写在化学名的首位,如化合物 **59** 所示,其构型命名与实际鉴定的构型应相反。若 *ent* 冠在二萜名称之前,则化学名与鉴定的结构的构型相同,如化合物 **6**。

57 **58**

59 **60**

hugorosenone(**61**)的^{1}H–NMR 和^{13}C–NMR ($CDCl_3$)数据如下:



61 **61**

第十节 贝壳杉烷二萜

贝壳杉烷二萜为四环二萜,用硒进行脱氢反应可以得到 1–甲基–7–异丙基菲(retene)或 1,7–二甲基菲(pimarthrene)的类似衍生物,说明贝壳杉烷母核是以氢化菲为母核。它的结构可以用 **62** 和 **63** 表示。**62** 的 A/B 环为反式、B/C 和 C/D 为顺式骈环,C–20 为 β–构型,C–5 为 α–构型,D 环为 α–构型,这类构型称贝壳杉烷(kaurane)。**63** A/B 为反式骈环,B/C 和 B/D 为顺式骈环,C–20 为 α–构型,C–5 为 β–构型,D 环为 β–构型,这类结构称 *ent*–贝壳杉烷(*ent*–kaurane)。

贝壳杉烷(**62**)[=(+)-kaurene]

贝壳杉烷(**63**)[=(−)-kaurene]

在天然界中,*ent*-kaurane 二萜发现和研究得较多,主要在香茶菜属(*Rabdosia*)中发现最多。发现的 *ent*-贝壳杉烷二萜在 C-17 甲基多被脱氢为环外双键,故又常称这类二萜为 *ent*-贝壳杉烯(*ent*-kaurene)。

ent-贝壳杉烷有下面五种类型的结构[23,24]:

1. C-20 无氧取代的 *ent*-贝壳杉烷二萜

C-20 无氧取代的 *ent*-贝壳杉烷二萜类化合物的结构可用 **63** 表示。自然界中分离了多种这类结构,如从 *Isodon kameba* 中分离的 kamebanin(**64**)、从冬凌草(*Rabdosia rubescens*)中分离的鲁山冬凌草甲素(lushanrubescensin A, **65**)。

64　**65**

目前,市售的甜菊苷为天然甜味剂,作为蔗糖的代用品,已广泛用于各种饮料中,供患糖尿病、高血压和食用低糖者使用。甜菊苷是从甜叶菊(*Stevia rebaudiaua*)中分离的 *ent*-贝壳杉烷二萜的混合物,其主要成分为甜菊苷(stevioside, **66**)。近年来发现甜菊叶中所含的另一化合物莱鲍迪苷 A(rebaudioside A, **67**)甜度高于甜菊苷,口感更接近于蔗糖。

66

67

2. C-20 氧取代 *ent*-贝壳杉烷二萜

C-20 氧取代 *ent*-贝壳杉烷二萜类化合物的结构,来源于 C-20 无氧化的 *ent*-贝壳杉烷的 C-20 被氧化,然后与 C-7 形成半缩醛或氧桥的结构。

这类化合物可用冬凌草甲素(rubescensin A, oridonin, **68**)和冬凌草乙素(rubescensin B, ponicidin, **69**),冬凌草丙素(rubescensin C,**70**)为代表,冬凌草甲素在冬凌草中含量最高,约含 0.34%,冬凌草乙素的含量约为 0.05%。冬凌草甲素和冬凌草乙素是冬凌草中抗癌的有效成分。

68

69

70

3. 6,7-开环 *ent*-贝壳杉烷二萜

6,7-开环 *ent*-贝壳杉烷二萜类化合物的结构,是由 *ent*-贝壳杉烷的 C-6 与 C-7 之间的键发生断裂所产生的,可用下式表示

开裂后,C-20 与 C-6 大多形成半缩醛,也有维持开环的形式的存在。若 C-7 与 C-1 生成一个六元环内酯,构成了 6,7 开环 *ent*-贝壳杉烷二萜的结构,分离自延命草(*Isodon trichocarpus*)中的延命草素(enmein, **71**),分离自毛叶香茶菜(*R. japonica*)中的毛叶香菜素 A 和 B(rabdosin A 和 B, **72** 和 **73**)均属此类结构。

71　　72　　73

从这类结构可以看出,C-6 与 C-7 发生裂环之后,B 环和 D 环沿着 C-10 和 C-9 键发生旋转,α-亚甲基环戊酮变为α-构型,C-9 位氢也为α-构型。

4. 8,9 开环 *ent*-贝壳杉烷二萜

从 C-8 和 C-9 键开裂的 *ent*-贝壳杉烷可用下式表示

从 *Rabdosia shikokiana* 分离的 shikodomedin (**74**)和 epoxyshikoccin (**75**)即为这类型的结构。它的结构实际上为 6/10/5 三个环稠合而成。五元环中存在有交叉共轭双烯酮(cross conjugated dienone)的结构。

74　　75

5. 螺旋开环 *ent*-贝壳杉烷二萜

从冬凌草中分离的卢氏冬凌草甲素(ludongnin A, **76**)、卢氏冬凌草乙素(ludongnin B, **77**)和贵州冬凌草素(guidongnin, **78**)为螺旋开环 *ent*-贝壳杉烷二萜。

76　　77　　78

第十一节　紫杉烷二萜

紫杉烷(taxane)二萜是从红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus* L.)植物中分离的以紫杉醇(taxol,**79**)为代表的二萜。紫杉醇已成为一个有效的抗肿瘤药物。1992年,美国食品药品管理局(FDA)批准紫杉醇上市,商品名为Taxol,用于治疗卵巢癌。紫杉醇除对卵巢癌有效外,对转移性乳腺癌、肺癌、头部和颈部肿瘤、恶性黑色素癌和淋巴肉瘤同样有效。美国BMS公司第一个把紫杉醇推上市场,继中国后,瑞典、法国、日本等40多个国家已有紫杉醇面市,我国上市的紫杉醇商品名为“紫烷素”,又称“紫杉醇注射液”(paclitaxel injection)。为此,紫杉醇已经成为重要的抗肿瘤药物之一,也是天然二萜化合物具有治疗人类重大疾病的活性的一个标志。

1971年,Wani和Wall从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中首次分离得到紫杉醇。直到现在,我们还只能认为紫杉烷(taxane)二萜化合物仅仅发现于红豆杉属植物之中。现已从红豆杉属植物中共分离得到400余种紫杉烷二萜化合物[25,28]。

从紫杉醇的结构看来,它是属于6/8/6/4四环稠合二萜,在C-4和C-5之间有一个四元氧环,C-13存在有一个酰氨的酯基,C-10和C-4各有一个乙酰基,C-2有一个苯甲酰基,C-9有一个羰基,C-7和C-1各有一个羟基,共有手性碳11个,紫杉醇经X射线证明C-2、C-3、C-4、C-13的取代基为α-构型,C-1、C-7、C-10的取代基为β-构型。另外一个紫杉烷衍生物cephalomannine(**80**)与紫杉醇的结构极其相近,紫杉醇与cephalomannine的分离特别困难。cephalomannine亦具有与微管结合抑制微管解聚的活性。

79　　　　**80**

此外,bacctin Ⅲ(**82**)和10-deacetyl bacctin Ⅲ(**83**)也是我们值得注意的衍生物。化合物**4**和**5**是半合成紫杉醇的重要原料。由10-deacetyl-bacctin Ⅲ为原料合成的紫杉醚(taxotere,**81**),具有同紫杉醇相近的活性,但毒副作用较小,1994年在墨西哥上市,用于治疗乳腺癌和肺癌等[25~28]。

81

82 R=Ac
83 R=H

随着研究工作的深入,其他稠合方式的紫杉烷相继被发现,特别是 abeo[①] 紫杉烷(abeo-taxane)在紫杉中被发现,abeo 紫杉烷理化常数与紫杉烷极为相似。它是 Fuji 用 X 射线研究 taxchinin A(**84**)的结构时发现的,它的骨架不同于紫杉烷。化合物 **84** 的结构表现在 A 环为五元环,C-15 连同其偕二甲基位于 C-1,游离于环之外,C-15 常被氧化,有一个羟基取代成为含氧季碳,C-11 同 C-1 直接成环。命名为 11(15→1)abeo 紫杉烷。Abeo 紫杉烷也有在 C-4 位存在环外双键,在 C-4 和 C-20位存在环氧乙烷和在 C-4、C-5 和 C-20 位存在 oxetane 三种形式存在。Abeo 紫杉烷的骨架是经过 X 射线加以证实的。

Abeo 紫杉烷重排反应的机理可以用 **85** 表示如下

taxchinin A(**84**)

85

Abeo 紫杉烷对 KB 细胞无抑制作用,但其抑制微管解聚作用与紫杉烷相同。紫杉醇的构效关系可用图 8-5 表示。

① Abeo 指化合物的键发生了转移,例如,11(15→1)abeo 紫杉烷是指 C-11 和 C-15 相连的碳键经转移成为 C-11 和 C-11 相连的碳键的紫杉烷。

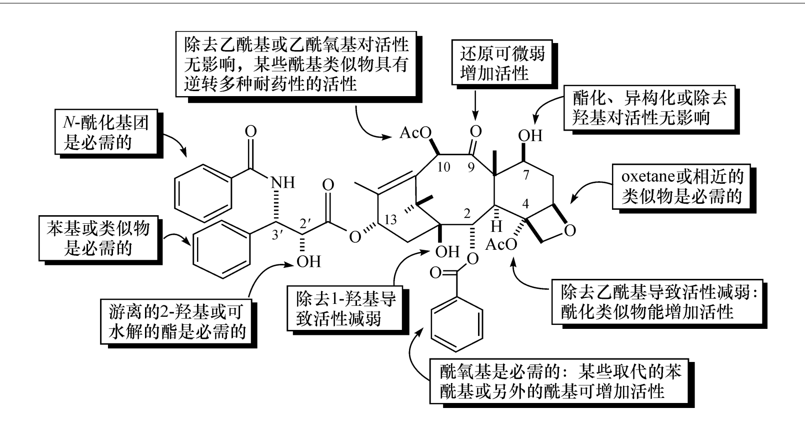


图 8-5　紫杉醇的构效关系图

紫杉醇的^{1}H-NMR 和^{13}C-NMR 数据分别如图 8-6、图 8-7 所示。

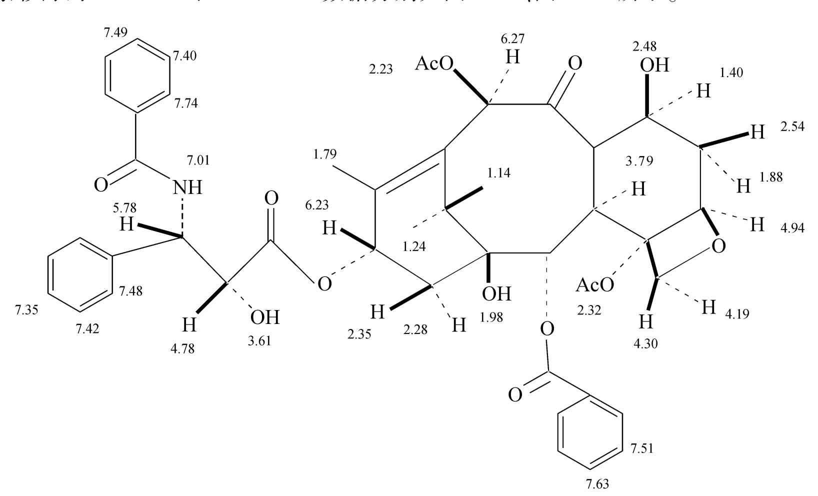


图 8-6　紫杉醇的^{1}H-NMR 图($CDCl_3$)

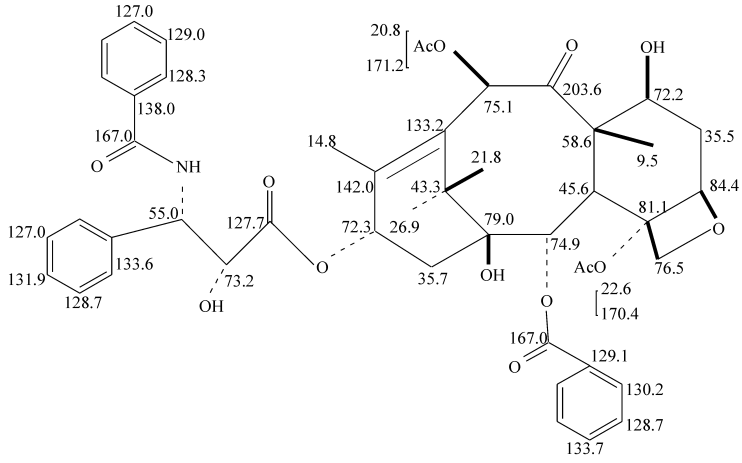


图 8-7　紫杉醇的^{13}C-NMR 数据($CDCl_3$)

第十二节　巴豆烷二萜

巴豆烷二萜具有强烈的刺激性、致炎和辅助致癌的毒性。巴豆烷二萜的结构骨架，是以 5/7/6/3 四个环稠合而成的。A/B 环大多以反式稠合，少数巴豆烷也有顺式稠合，顺式稠合以 4α-命名，例如，大戟二萜醇(Phorbol，**86**)的 A/B 环为反式稠合，4α-大戟二萜醇(4α-phorbol，**87**)的 A/B 环为顺式稠合。大戟二萜醇和 4α-大戟二萜醇可用 CD 谱加以区别，前者的 Cotton 效应为 +220nm，后者的 Cotton 效应为 -250nm。大戟二萜醇 B/C 环为反式稠合，C/D 环为顺式稠合。大戟二萜醇具有多个羟基，位置在 C-4、C-9、C-12、C-13 和 C-20。C-3 位上有一个羰基，$C_{1,2}$ 和 $C_{6,7}$ 各一个双键，C-3 位羰基和 $C_{1,2}$ 双键形成一个 α,β-不饱和酮。大戟二萜醇多以酯的形式存在。常见的有 4-去氧大戟二萜醇(4-deoxy-phorbol)、12-去氧大戟二萜醇(12-deoxyphorbol)、12-去氧-16-羟基大戟二萜醇(12-deoxy-16-hydroxy-phorbol)、16-羟基大戟二萜醇(16-hydroxy phorbol)等的酯，在大戟属植物中主要以 12-去氧大戟二萜醇酯较多，主要以单酯、双酯或三酯的形式存在[29,30]。

86　　　　**87**

巴豆烷二萜刺激性最强或称具有开放性刺激(free irritant)的为12–O–十四烷酰基大戟二萜醇–13–乙酸酯(12–O–tetradecanoyl–phorbol–13–acetate),简称TPA或称巴豆因子A_1(croton oil factor A_1),其ID_{50}^{5}为0.010nmol/耳,ID_{50}^{24}为0.016nmol/耳。

TPA和巴豆因子S的结构如下

TPA
R_1 = H
R_2 = CO CH_3
R_3 = $CO(CH_2)_{12}CH_3$

巴豆因子S
R_1 = $CO(CH_2)_6(CH_2CH{=}CH)_3\ CH_2CH_3$
R_2 = CO CH_3
R_3 = $CO(CH_2)_{10}CH_3$

大部分巴豆烷二萜都从生长在国外的大戟属植物中分离出。从生长在我国的狼毒大戟(*Euphorbia. fischeriana*)中分离的三种巴豆烷二萜,分别为化合物**88**、化合物**89**和protratine(**90**)。[10]

88 **89** **90**

大戟二萜醇的光谱数据如图8–8、图8–9所示。

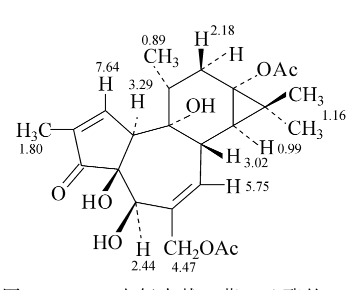


图 8－8　12-去氧大戟二萜二乙酯的 ^{1}H-NMR 数据($CDCl_3$)

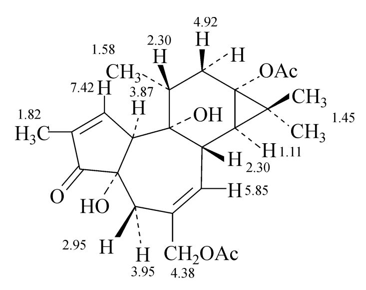


图 8－9　4α-大戟二萜醇的 ^{1}H-NMR 数据(Py-d_5)

第十三节　巨大戟烷二萜

巨大戟烷型二萜酯是大戟科中发现较早、数目较多的二萜，有刺激致炎和辅助致癌的作用。巨大戟烷二萜的基本母核，如巨大戟醇(ingenol，**91**)，是由 5/7/7/3 四个环稠合而成，C-8 和 C-10 间存在一个酮桥，$C_{1,2}$ 的双键存在于 A 环，$C_{6,7}$ 的双键存在于 B 环，C-4 为 β-羟基，说明 A/B 环为反式骈环。一个环丙烷构成 D 环。巨大戟醇的结构是以巨大戟醇三乙酸酯(**92**)的结晶，利用 X 射线衍射加以确定的[29,30]。

91　R_1=R_2=R_3=H　　　**92**　R_1=R_2=R_3=AC

C-20 的羟基是巨大戟二萜显现刺激性的主要基团。例如，3-*O*-tetradecanoyl-ingenol 的 ID_{50}^{24} 为 0.01nmol/耳，但 20-去氧巨大戟醇-5-酰基酯几乎无刺激性(ID_{50}^{24} >100nmol/耳)[33,34]。

第十四节　假白榄烷二萜

假白榄烷(jatrophane)二萜，结构骨架由两个环稠合而成，即 5/12 两个环。从甘遂(*E. kansui*)中分离得到 kansuinin A～ H[35,36]。

kansuinin B　R_1 = H, R_2 = Ac

kansuinin C　R_1 = Ac, R_2 = H

	R_1	R_2
kansuinin F	OBz	OBz
kansuinin G	H	ONic
kansuinin E	OBz	ONic

	R_1	R_2	R_3
kansuinin H	OH	Bz	Ac
kansuinin D	H	Bz	Nic
kansuinin A	H	Bz	Ac

Kansuinin A、D 和 E，特别是 kansuinin E，在 fibroblast 细胞上对 TrkA 有高度的表达，显示了对神经生长因子受体具有高亲和力（ED_{50} = 0.23μg/mL）。

第十五节　其他类型的二萜

（1）银杏内酯

从银杏（*Ginkgo biloba* L.）叶中分离的银杏内酯 A、B、C、J、M（ginkgolides A、B、C、J、M）的二萜内酯，由 6 个五元环组成一个非常刚性的骨架，顺式稠合的五元环 F、A、D 和 C 形成一个半球状的空洞。D 环为一个四氢呋喃环占据笼状空洞的中心，D 环的醚、C 环和 F 环酯氧原子构成类似冠醚的结构。银杏内酯为强的 PAF 拮抗剂。银杏内酯 A、B、C 的混合物用于治疗支气管哮喘药已经上市。另外，对于脑细胞和心肌细胞都呈现出保护作用[37,38]。

ginkgolide A　$R_1 = R_2 = H$，$R_3 = OH$

ginkgolide B　$R_1 = OH$，$R_2 = R_3 = H$

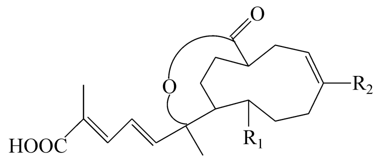
ginkgolide C　$R_1 = R_2 = R_3 = OH$

ginkgolide J　$R_1 = H$，$R_2 = R_3 = OH$

ginkgolide M　$R_1 = R_2 = OH$，$R = H$

(2) 金钱松二萜

土槿皮为松科金钱松(*Pseudolarix kaempferi*)的树皮,具有抗菌作用。其活性成分为二萜化合物,即土槿皮酸(pseudolaric acid)甲、乙、丙。土槿皮甲酸和乙酸显示抗早孕的活性[39,40]。



土槿皮甲酸　$R_1 = Ac$，$R_2 = CH_3$

土槿皮乙酸　$R_1 = Ac$，$R_2 = COOCH_3$

土槿皮丙酸　$R_1 = H$，$R_2 = COOCH_3$

参 考 文 献

[1] 山桥博等. 天然物化学(第二版). 江南堂, 1987, 102

[2] Hanson J Q et al. Method in Plant Biochemisty. New York: Academic press, 1991, 263

[3] Bhat S R et al. Tetrahedron Lett, 1971, 1669

[4] Matsuda T. Chem Pharma Bull, 1994, 42:1216

[5] (a) Min Z D et al. Chem Pharm Bull, 1989, 37:2505

(b) Min Z D et al. Chem Pharm Bull, 1990, 38:3167

(c) Min Z D et al. Chem Pharm Bull, 1995, 43:2253

[6] Xie N et al. Phytochemistry, 1991, 30:1

[7] Xie N et al. Chem Pharm Bull, 1992, 40:2193

[8] 徐建华. 昆虫学报, 1998, 41:199

[9] Wang X W et al. Drug of the Future, 1999, 40:2193

[10] 泰国伟. 中药研究与开发. 北京:科学出版社, 2000, 93
[11] Shi H M et al. Planta Medica, 2005, 71: 349
[12] Fan T P. J Asian Nat Prod Research, 2000, 2:237
[13] Liang J Y et al. Chem Pharm Bull, 1987, 35:2613
[14] Hanson J R. Nat Prod Reports, 1991, 8:5
[15] Elmon B. Org Mag Reson, 1981, 8:5
[16] Taran B. ibid, 1987, 23:1091
[17] Connolly j D. ibid, 1981, 17:163
[18] Arijun H et al. Tetrahedron Lett, 2003, 44:6879
[19] Abed A et al. Org Mag Reson, 1990, 2:529
[20] Nakanish K et al. Nat Prod Chem, 1974, 1: 231
[21] Steveb M A. Phytochemistry, 1988, 49: 1107
[22] Ladislous K et al. Ibid, 1988, 49:1107
[23] 孙汉董等. 香茶菜属植物二萜化合物. 北京:科学出版社, 2001
[24] Fujita E et al. Progress in the Chemistry of Org Nat Prods, 1984, 46: 78
[25] Kingston D G I et al. J Nat Prod, 2000 63:726
[26] Appendino G. Natural product Reports, 1955, 12:349
[27] 魏秀丽等. 抗癌药紫杉醇的研究及构效研究进展. 药学前沿. 北京:中国医药科学出版社, 2003, 127
[28] 闵知大. 天然产物化学(第二版). 北京:科学出版社, 2004, 305
[29] Evans F J et al. Progress in the Chemistry of Org Nat Prods, 1983, 44: 1
[30] Hiroho I. Bioactive Molecule. Vol. 2. Natural Occuring Carcichigeus of Plant Origin-Toxicogy. Pathology and Biochemistry. Tokyo: Kodansha, 1987, 181
[31] Wang L Y et al. J Nat Prod, 2002, 65:1246
[32] Wang L Y et al. Chem Pharm Bull, 2003, 51:935
[33] 焦莹. 中草药, 1990, 21:39
[34] 周炳南. 天然产物化学. 北京:科学出版社, 2003, 305
[35] Pan Q et al. Chim Chem Bull, 2003, 51: 935
[36] Pan Q et al. J Nat Prod, 2004,67:1548
[37] 陈仲良. 天然产物化学(第二版). 北京:科学出版社, 2004, 378
[38] Kitai M et al. Drug, 1991, 42:9
[39] Zhou B N et al. Planta Medica, 1983, 47:35
[40] 王伟成等. 中国药理学报, 1982, 3:188

第九章　皂　　苷

第一节　概　　述

皂苷是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷,根据皂苷的苷元类型可分为三萜皂苷和甾体皂苷。根据苷元连接糖链数目的不同,可分为单糖链皂苷、双糖链皂苷及三糖链皂苷,在一些皂苷的糖链上,还通过酯键连有其他基团。皂苷类化合物主要分布于陆地高等植物中,其中甾体皂苷主要存在于薯蓣科、百合科和玄参科等;三萜类皂苷主要存在于五加科、豆科、远志科及葫芦科等。此外,海星、海参等海洋生物也存在皂苷类化合物。

在皂苷的化学结构中,苷元具有不同程度的亲脂性,糖链具有较强的亲水性,使皂苷成为一种表面活性剂,用力振荡其水液可产生持久性的泡沫。一些富含皂苷的植物提取物被用于制造乳化剂、洗洁剂及发泡剂等。此外,一些皂苷对细胞膜具有破坏作用,表现出毒鱼、灭螺、溶血、杀精及细胞毒等活性。

第二节　皂苷的提取与分离

皂苷类化合物因极性大,需要用醇、水或其混合物将其提取出来,通常是用甲醇或工业乙醇提取,减压浓缩所得提取液,再用氯仿或乙酸乙酯与水分配,以除去脂溶性成分,最后用水饱和的正丁醇与水分配,浓缩所得的正丁醇溶液即为皂苷富集部位。某些皂苷分子的糖片段有亲脂基团取代时,也可能使皂苷溶于氯仿、乙酸乙酯等较低极性溶剂中。

作为一种初步的纯化方法,沉淀法以往常被用于皂苷的分离。向富含皂苷的甲醇或乙醇液中倾入大量的乙醚或丙酮,可将皂苷类化合物沉淀出来。此外,利用皂苷与胆固醇形成沉淀的特性也可进行初步纯化。在目前皂苷类成分的研究及工业生产中,大孔吸附树脂获得广泛的应用。

一、大孔吸附树脂色谱

大孔吸附树脂是一类由苯乙烯等小分子物质聚合而成的高分子担体,根据其结构单元不同分为各种型号。国内生产的 D-101 型、DA-201 型等大孔吸附树脂都适用于皂苷类天然产物分离纯化。

对新购得的大孔吸附树脂通常需要用丙酮、甲醇或乙醇多次浸泡洗涤,以除尽

其中包含的有机杂质,然后用水充分交换即可使用。将通过溶剂分配法富集的皂苷部位溶于水,上样至大孔吸附树脂柱,先用水洗去糖及蛋白质等成分,然后用梯度甲醇或乙醇洗脱,可获得更为精制的总皂苷。选择合适的大孔吸附树脂,采用梯度洗脱方式可将粗提物中的皂苷与其他苷类成分,如黄酮苷、环烯醚萜苷等分开,有利于后续的皂苷纯化工作。在大多数情况下,用大孔吸附树脂只能获得皂苷混合物,为进一步获得皂苷单体,一般还需要采用其他色谱方法分离。

二、硅胶色谱

硅胶色谱常被作为继大孔吸附树脂分离之后的又一种分离手段。硅胶对皂苷这类高极性化合物的吸附作用较大,利用硅胶色谱分离皂苷可能会导致样品的损耗,不适用于微量皂苷成分的分离。在用硅胶色谱分离皂苷类化合物时,经常采用氯仿-甲醇-水三元溶剂系统。在氯仿-甲醇溶剂系统中加入适量的水,可克服皂苷类化合物进行硅胶色谱时产生的拖尾现象,获得更好的分离效果。

三、反相色谱

自 1980 年以来,反相填料的普及应用促进了皂苷类化合物的分离纯化工作。目前用得最多的反相担体是十八烷基键合硅胶(octadecylsilane,ODS)和辛烷基键合硅胶。水与甲醇、乙腈或乙醇不同比例的混合物是反相色谱中最常用的溶剂。使用乙腈-水溶剂系统时,色谱柱的阻力小,常被用于高效液相色谱分离。由于乙腈较甲醇及乙醇价格更昂贵且毒性大,在初步阶段的皂苷反相色谱分离中一般不采用。与正相色谱相反,减小洗脱溶剂中水的比例可增大反相色谱中洗脱液的洗脱能力。

Merck 公司生产的 RP-18 Lobar 预制柱是实验室进行皂苷类化合物分离的有效装置。作者利用 RP-18 Lobar 预制柱对植物玉叶金花(*Mussaenda pubescens*)的化学成分进行了分离,以乙醇-水、乙腈-水为洗脱剂,获得一系列新三萜皂苷类化合物[1]。可采用反相薄层色谱选择反相柱色谱的洗脱溶剂及对分离效果进行检测。Merck 公司生产多种规格的高效反相薄层板。在对一些皂苷进行 RP-18 反相薄层检测时,需要展开剂中水的比例达到或超过 50%,这时使用普通的反相薄层板展开速度很慢或无法展开。采用吸附剂中加入亲水性物质的 Merck RP-18 WF254 型反相薄层板则可使展开剂中水的比例不受限制。

四、液-液分配色谱

液-液分配色谱用于皂苷类化合物的分离纯化,其优点在于不会对极性高的皂苷类化合物造成不可逆吸附。Diallo 等报道采用氯仿-甲醇-异丁醇-水(7∶6∶3∶4)溶剂系统,用 MLCCC 仪器从药用植物积雪草(*Centella asiatica*)的提取物

中成功分离出积雪草苷(asiaticoside)和羟基积雪草苷(madecassoside),两个化合物之间只有一个羟基的差别[2]。

第三节　皂苷结构的研究方法

高兆周核磁共振仪器的应用使皂苷的结构鉴定趋于快速、微量化。皂苷结构的研究一般包括苷元和糖片段的结构鉴定,以及苷元与糖片段之间连接位置的确定。在一些皂苷类化合物结构中,苷元或糖片段还可与其他羧酸通过酯键连接,此时还需要确定这些片段的结构及其连接位置。前人已对三萜及甾体化合物做过大量化学研究工作,因此皂苷元的结构鉴定一般是通过与文献报道核磁数据进行比较。本节主要介绍糖片段的结构研究方法。糖片段的结构测定主要包括:确定糖的种类和分子数;糖的连接位置;糖的连接顺序;糖环的大小和端基构型以及糖的绝对构型。下列方法在皂苷结构研究中常被采用。

一、苷键的裂解

在皂苷的结构研究中,苷键的裂解占有重要的位置。通过苷键裂解反应除可获得苷元的单体以及糖的信息外,还可获得次级皂苷。苷键裂解的方法主要有以下几种:

(一) 酸水解

苷键是缩醛结构的一部分,易为酸所水解。酸水解反应速率与糖和苷元的结构有关,一般来说去氧糖的水解速率较快,呋喃糖比相应的吡喃糖快,五碳糖比六碳糖水解速率快。水解速率与糖在苷元上的连接位置也有关。酸水解的一般方法是将皂苷溶于 HCl 或 H_2SO_4 溶液中(如不溶解可以加甲醇、乙醇等极性溶剂助溶)加热一段时间,然后减压蒸去有机溶剂,水溶液用有机溶剂萃取出皂苷元,或用过滤法收集析出的皂苷元沉淀。除去皂苷元后的水溶液用碱或阴离子交换树脂中和,然后采用纸色谱、薄层色谱或气相色谱与标准品比较鉴定水解生成的单糖。对于含有两个以上糖单元的皂苷,由于各个苷键对酸的稳定性不同,有可能通过改变酸的浓度或水解反应的温度和时间得到次级皂苷。

(二) 二相酸水解(缓和酸水解)

酸水解反应条件太剧烈时,一些皂苷元结构会发生变化,使研究工作变得复杂。二相酸水解是指在酸水解反应液中加入一有机相,如苯、甲苯等,反应过程中苷元一旦生成就转入有机相,从而避免了进一步与酸的接触,使苷元的副反应得到抑制。

(三) Smith 降解

过碘酸钠可以在不影响其他邻位双官能团的情况下选择性氧化邻二羟基。皂苷分子中含有邻二羟基的糖片段在过碘酸钠氧化下生成二醛中间体。二醛中间体用硼氢化钠还原,然后室温下酸处理即得到失去含邻二羟基糖片段的皂苷元或次级苷,该方法称为 Smith 降解[3]。Smith 降解条件很温和,许多在酸水解条件下不稳定的皂苷元都可以用 Smith 降解获得真正的苷元。

(四) 酶解

糖苷酶(glycosidase)是一类催化糖苷生物合成的酶,在合适的条件下它也能催化糖苷的分解。由于酶几乎是在与生物体内相同条件下催化底物的化学反应,采用糖苷酶来裂解苷键可最大限度地减少反应过程中苷元的化学变化,而且酶解选择性强,如苦杏仁酶只酶解 β-D-葡萄糖。常见的糖苷酶有苦杏仁酶(emulsin)、麦芽糖酶(maltase)、纤维素酶(cellulase)、高峰淀粉酶(takdiastase)、粗橙皮苷酶(crude hesperidase)等。在进行皂苷酶解反应时,可将含有皂苷与糖苷酶的水液在37℃条件下保温数天,根据薄层色谱检测水解反应的进行情况。水解反应完全后,可用乙酸乙酯萃取水溶液以获得苷元,经过简单的色谱纯化,甚至不用纯化即可直接进行分析测试。萃取后的水溶液可用于进一步鉴定皂苷中糖的种类、比例及绝对构型等。

(五) 碱水解

五环三萜皂苷中有很大一部分含有酯苷键。对于含有酯苷键的皂苷,可用碱水解方法选择性地断裂酯键,而不影响醚苷键。碱水解的方法通常是将皂苷在氢氧化钠的水溶液中水浴加热一段时间。反应进行的情况及反应条件的选择,如碱液的浓度、反应时间及反应温度等应由薄层色谱确定。

二、色谱法在皂苷结构研究中的应用

在研究皂苷中糖部分的结构时,色谱法对于确定糖链中糖的种类、比例及绝对构型十分有用。

(一) 硅胶薄层色谱

用硅胶薄层色谱检测皂苷中糖的种类时,是将水解所得糖溶液与糖的标准品进行对照。糖在硅胶薄层上展开时,容易出现拖尾现象,点样量不宜过多。用硅胶薄层检测糖时所用的展开剂可为氯仿-甲醇-水、乙酸乙酯-正丁醇-水或丙酮-正丁醇-水三元系统,也可用乙酸乙酯-甲醇-水-乙酸(13∶3∶3∶4)四元溶剂系统。孔

繁华等在研究土贝母皂苷甲的结构时,将皂苷的酸水解液与糖的标准品同时在硅胶薄层上进行两次展开,发现存在鼠李糖、木糖、阿拉伯糖和葡萄糖,所用展开剂为丙酮–正丁醇–水(5∶4∶1),四种糖的 R_f 值分别为 0.62、0.49、0.35 和 0.21[4]。

(二) 气相色谱

气相色谱由于灵敏度高,又可同时进行分离、定性和定量测定,自从 20 世纪 50 年代末用于糖的结构分析以来,一直是皂苷结构研究的重要手段。气相色谱主要用于皂苷中糖的种类鉴别、糖连接位置及糖绝对构型的测定。糖的极性大,难挥发,通常是将其制备成甲醚、三甲硅醚或乙酰化合物等容易挥发的衍生物后进行检测。由于糖的端基异构体的存在,以往通常是将全甲基化的化合物水解,经硼氢化钠还原,乙酰化,然后再进行气相色谱分析。通过与标准品对照,可确定糖的种类及糖之间的连接位置。

人们以往认为天然皂苷中的糖仅以一种异构体形式,即 D–型或 L–型存在于自然界中,通常不对糖的绝对构型进行鉴定。但由于糖的另一个对映异构体也存在于某些生物体内,因此有必要确证糖的绝对构型。Hara 等报道利用糖的醛基与手性化合物 L–巯基丙氨酸甲酯进行缩合反应,将反应产物进行乙酰化或三甲基硅醚化,然后进行气相色谱检测。该方法较简单,在普通的气相色谱条件下,几乎所有醛糖的对映体都可被很好地分开[5]。

三、波谱法在皂苷结构研究中的应用

(一) 质谱

皂苷是一类极性大、热不稳定、难挥发的天然产物。目前普遍采用各种软电离质谱技术,如电喷雾电离质谱(ESIMS)、快原子轰击质谱(FABMS)等来测定皂苷类化合物的相对分子质量。在这类质谱图中,当选用负离子检测方式时,可观测到 $[M-1]^-$ 等的准分子离子信号;如选用正离子检测方式,则可观察到 $[M+H]^+$、$[M+Na]^+$ 和(或) $[M+K]^+$ 等准分子离子信号。结合使用正、负离子检测方式可帮助确定皂苷的相对分子质量。

在皂苷的软电离质谱中,有时还可观察到一组连续失去糖单元的碎片离子信号,根据这些离子间的质量差可推测依次失去的是五碳糖(–132)、六碳糖(–162)、6–去氧糖(–146)或己糖醛酸(–176),由此可帮助确定皂苷结构中糖的连接顺序。

(二) 核磁共振谱

传统的皂苷结构研究常常需要进行大量的化学工作。与其他小分子天然产物相比,皂苷的结构鉴定似乎更得益于核磁共振技术的进步。在高兆周核磁共振谱

图中,皂苷的苷元及糖部分的复杂信号可以得到较好的分辨。由于核磁共振法不破坏样品,使微量皂苷的结构鉴定成为可能,当样品量有限时应首选该法。下面简要介绍在测定皂苷糖链结构时常用的核磁共振方法。

1. 1D-NMR 谱

皂苷类化合物的氢谱一般是在氘代吡啶、氘代甲醇或重水中测定。糖的异头质子一般出现在 4.3~5.9ppm,如是酯苷键,则出现在 6.0ppm 以上。异头质子的化学位移与糖的种类及连接位置有很大关系。异头质子由于处于较低场,大多数情况下与糖上其他质子信号分离。因此,根据异头质子信号的数目可判断皂苷中所含的糖单元数。在吡喃糖苷中,六元环一般呈固定的椅式构象,对于葡萄糖及半乳糖等,2-位质子处于竖键,如异头质子为α-构型,处于横键,H-1 与 H-2 两面角约为 60°,则异头质子的偶合常数为 2~4Hz。如果端基质子为β-构型,处于竖键,H-1 与 H-2 两面角约为 180°,则异头质子的偶合常数为 7~9Hz。因此,利用异头质子的偶合常数可确定上述两类糖的异头构型。对于甘露糖及鼠李糖,2-位质子处于横键,无论端基质子为α-或β-构型,H-1 与 H-2 之间的偶合常数都很小,利用异头质子的偶合常数难以区分其端基构型[6]。6-去氧糖在氢谱中 δ1.5~1.7ppm 出现一双峰甲基信号,偶合常数为 6~7Hz,这也是鉴定糖的一个重要信息。当皂苷中含糖单元数目较多时,除异头质子之外的其他连氧碳上的质子信号在 δ3.5~4.5ppm 之间严重重叠,仅从 ^{1}H-NMR 谱难以获得更多糖链结构信息。

与 ^{1}H-NMR 谱相比,^{13}C-NMR 信号分散在 200ppm 的范围内,彼此重叠的可能性减小。对于氧苷,糖的异头碳信号出现在 90~112ppm 之间,其中醚苷键在较低场,一般 >98ppm;酯苷键在较高场,在 95ppm 左右。根据此区域出现的异头碳数目,再辅以 60~85ppm 区域糖基其他碳信号的数目,可以确定皂苷分子中糖单元数。苷类化合物中经常出现的各种单糖的碳谱数据已有很多报道。当皂苷中含糖单元的数目为一两个时,从糖碳化学位移可帮助判断糖的种类。另外,糖醛酸、6-去氧糖等可由碳谱获得明确的信息。根据糖中各碳的化学位移,还可确定糖环的大小。例如,对于醛糖,呋喃型较之相应的吡喃型,其 C_1、C_2、C_4 信号向低场位移 4~14ppm,C_5 信号则一般向高场位移 4~7ppm。吡喃糖的α-型异构体,C_1、C_2、C_3 和 C_5 的化学位移较相应的β-异构体向高场移动 2~7ppm,D-甘露糖与 L-鼠李糖除外,它们的α-,β-异构体的 C_1、C_2 化学位移无明显差别,但利用 C_3、C_5 化学位移的差别可以区分两者的α-、β-异构体,这一点利用 ^{1}H-NMR 中异头质子的偶合常数难以区分。

确定苷键位置是 ^{13}C-NMR 谱的主要功能之一。根据各糖碳信号与相应糖的甲苷间的信号差异(即苷化位移),可获知苷化位置。苷化位置的碳(C_α)一般向低场移动 4~10ppm,C_β 则大都向高场移动 0.9~4.6ppm,其他的碳化学位移基本不

变。当糖上两个邻位羟基分别被苷化时,苷化位移的数值与正常的苷化位移会有较大差别,这时确定糖单元的连接位置需要采用 NOE 或碳氢远程相关实验。

2. 2D-NMR 谱

当皂苷含糖单元数目较多时,其氢谱中糖质子信号高度重叠,有时只能辨认出异头质子、6-去氧糖中的甲基等信号。随着高兆周核磁共振仪器的发展,氢谱中糖上质子信号的分辨率获得改善,这为利用二维核磁共振技术进行糖链结构的从头解析创造了条件。

进行从头解析的第一步是要对糖链中各糖的质子信号进行归属。由于糖主要含链状的质子偶合系统,因此很适合于用 ^1H-^1H COSY 谱及 TOCSY (2D-HOHAHA)谱归属各组糖的信号。一般方法是从孤立的异头质子或 6-去氧糖的双峰甲基信号开始,根据一系列相关点确定糖中其他质子的化学位移。为更清晰地利用核磁共振方法确定糖链的结构,有时可先对皂苷进行全乙酰化。与乙酰氧基相连碳上的质子出现在低场,而苷化位置及其他不连游离羟基的碳上质子处于高场。一般糖上与乙酰氧基相连的次甲基质子(>CHOAc)化学位移为 δ4.7~5.4ppm,在 δ3.0~4.3ppm 之间的质子为—CH_2OAc、>CHOR 及—CH_2OR。在这两个区间的为异头质子。酯苷键中糖的异头质子在 δ5.5ppm 以上。经全乙酰化后,糖上的质子信号在 ^1H-NMR 谱上分散范围变大,利用 ^1H-^1H-COSY 谱对糖上质子进行归属更容易,同时可得出糖之间连接位置的信息[7]。结合分析 ^1H-^1H-COSY 谱及 TOCSY 谱,对于糖链质子信号的归属更为迅速、可靠。

在归属了糖中各质子的化学位移后,进一步利用碳氢相关谱(如 HMQC 或 HSQC 谱)可对糖中各个碳信号进行归属。通常情况是在质子信号归属之后再利用碳氢相关实验归属碳信号,但有时在归属六碳糖的六位及五碳糖的五位两质子化学位移时会遇到困难,此时不妨借助于碳氢相关实验获得这对偕质子的化学位移信息。

在皂苷的 ^{13}C-^1H 远程相关(HMBC)图谱中,可观测到糖的异头质子与该糖单元所连接碳的相关信号及糖的异头碳与该糖单元所连碳上质子间的相关信号,根据这些信号可判断糖单元之间和糖与非糖部分的连接位置。在皂苷的 NOESY 或 ROESY 谱中,可观测到糖的异头质子与其所连碳上的质子之间的 NOE 相关点,由此可确定糖单元的连接位置。对于中等大小的分子(相对分子质量 1000 左右),有些应出现的 NOE 效应在 NOESY 谱中看不到,采用 ROESY 实验可避免这种情况,许多皂苷类化合物的相对分子质量在 1000 左右,如果 NOESY 实验解决不了问题,可采用 ROESY 实验[8]。

第四节 皂苷的生物活性

皂苷类化合物具有多种生理功能,是许多植物药的主要活性成分。Rao 等和俞飚最近对皂苷类化合物具有的生物活性进行了综述,这些活性主要包括抗肿瘤、免疫调节、抗炎、降胆固醇、保肝、降血糖、抗微生物、心血管系统活性等[9,10]。下面简要介绍皂苷的一些主要生物活性。

一、抗肿瘤和细胞毒作用

许多皂苷类化合物具有细胞毒和抗肿瘤作用。从中药土贝母(*Bolbostemma paniculatum*)中分离得到的具有酯环双糖链结构的三萜皂苷土贝母苷甲(tubeimoside Ⅰ)和从人参中分离得到的三萜皂苷人参皂苷 Rg_3 都具有抗肿瘤作用[11,12]。一些皂苷的抗肿瘤作用与其免疫调节作用有关[13]。皂苷的细胞毒作用往往与其表面活性有关,静脉注射这类皂苷可能产生严重溶血作用。

二、免疫调节作用

免疫系统与人体的健康关系十分密切。提高人体免疫能力的药物可用于肿瘤、艾滋病和其他感染性疾病的预防和治疗及抗衰老等。许多皂苷具有调节人体免疫系统的功能,如著名的人参皂苷、绞股蓝皂苷等。

一些皂苷除直接对免疫系统功能有促进作用外,还被用作免疫辅助剂,用于预防及治疗性疫苗的研究开发。将抗原与皂苷结合可帮助这些大分子通过细胞膜及肠黏膜,促进其吸收,从而增加注射及口服疫苗的有效性。从南美洲植物 *Quillaja saponaria* 中获得的三萜皂苷纯品 QS-21 具有很强的免疫促进活性而无细胞毒作用,目前国外正试验将其开发为艾滋病疫苗的免疫辅助剂[14]。

从植物商陆(*Phytolacca esculenta* Van Houtte)中得到的三萜皂苷商陆皂苷甲(esculentoside A)具有免疫抑制功能,这可部分解释该化合物所具有的广泛且显著的抗炎作用[15]。

三、抗微生物作用

人们通过长期研究,发现很多皂苷具有抗植物致病原体和人类致病原体的作用。

(一) 抗病毒作用

柴胡皂苷能抑制多种 DNA 和 RNA 病毒,能不可逆地灭活单纯疱疹病毒,对 HIV 也有抑制作用。甘草甜素在 5μmol/L 浓度时可体外灭活麻疹病毒和疱疹病毒。从人参及西洋参茎叶中分得的皂苷对 HSV-1 病毒的感染有保护作用,进一步

研究表明其活性成分为 Rb 系列人参皂苷,尤其是人参皂苷 Rb_2[16]。

(二) 抗真菌作用

文献报道的具有抗真菌作用的皂苷较多。一种皂苷抗真菌的机制被认为是皂苷与真菌浆膜中的甾醇形成一种复合物,破坏了真菌细胞膜的通透性。Takechi 等研究了植物 *Hedera rhombea* 中α-常春藤皂苷的结构与抗真菌及溶血活性的关系,发现结构中末端鼠李糖对抗真菌活性更重要,而结构中的游离羧基对溶血活性更重要[17]。一些皂苷由于具有抗微生物作用,还被添加于化妆品中。

四、心血管系统活性

心血管系统疾病是危害人类健康的最主要疾病之一。许多皂苷类化合物具有包括降低胆固醇、抗低压缺氧、抗心律失常、正性肌力作用及毛细血管保护作用等。三七皂苷对心肌缺血和再灌注损伤具有保护作用[18]。三七中含有的人参皂苷 Rb_1 的抗脑缺血作用与其钙拮抗有关[19]。从三七中分离得到的人参三醇型皂苷对冠状动脉结扎诱发的缺血再灌注心律失常具有对抗作用[20]。黄芪皂苷能显著改善心肌收缩性,减少冠脉血流,对心肌功能具有保护作用[21]。一些薯蓣皂苷对治疗冠心病有效,可减少心绞痛,调节新陈代谢[22]。

五、抗炎、抗渗出、抗水肿作用

炎症的初期阶段常常表现为血管通透性的增加,组胺、血胺和碱性多肽的释放,并伴随充血和血肿的形成。一些皂苷具有抗渗出、抗水肿作用,也是一类抗炎物质。例如,从七叶树科植物天师栗(*Aesculus wilsonii*)干燥成熟果实(娑罗子)中提取得到的七叶皂苷具有抗炎、消肿、增加静脉张力等功效,已被用于临床,治疗脑水肿等病症。

六、其他作用

除上述生物活性外,皂苷还具有多种其他活性。例如,枣仁皂苷具有镇静作用;柴胡皂苷具有退热及保肝作用;辽东楤木及远志等植物中分离得到的三萜皂苷具有抑制乙醇及葡萄糖吸收作用;甘草酸具有促肾上腺皮质激素(ACTH)样活性,临床用为抗炎药,并用于胃溃疡病的治疗;甘草皂苷及罗汉果皂苷具有甜味,被用作甜味剂添加于食品,等等。

第五节　三萜皂苷

一、三萜皂苷元简介

三萜是由 30 个碳原子组成的萜类化合物。三萜类化合物广泛存在于植物界,

单子叶植物和双子叶植物中均有分布。其中,五加科、豆科、桔梗科、玄参科等植物中三萜含量较高。三萜也存在于动物体中,如从羊毛脂中分得羊毛脂醇。由真菌灵芝中也曾分离出许多三萜成分。除陆地生物外,从海参、软珊瑚等海洋生物中也分离出多种类型的三萜化合物。

二、三萜皂苷的主要结构类型

(一) 四环三萜类

1. 羊毛甾烷型

羊毛甾烷(lanostane,**1**)型四环三萜的结构特点是 A/B、B/C、C/D 环均为反式。C-10、C-13 位均有 β-甲基,C-14 位有 α-甲基,C-17 位为 β-侧链,C-20 位为 *R*-构型。

1

中药黄芪(*Astragalus membranaceus*)具有增强免疫、利尿作用,从中分出多种三萜皂苷,其苷元均为环黄芪醇(cycloastragenol,**2**),化学命名为(20*R*,24*S*)-3β,6α,16β,25-tetrahydroxy-20,24-epoxy-9,19-cyclolanostane。黄芪苷Ⅰ(astragaloside Ⅰ,**3**)皂苷元的 3-位和 6-位羟基分别与一分子糖相连,糖分子上还有乙酰基取代,文献报道该化合物具有免疫促进作用[23]。黄芪苷Ⅳ(astragaloside Ⅳ,**4**)是黄芪中最重要的皂苷,黄芪苷Ⅶ(astragaloside Ⅶ,**5**)则是自然界发现的第一个三糖链三萜皂苷[24]。

	R_1	R_2	R_3
2	H	H	H
3	xyl(2,3-diAc)	glu	H
4	xyl	H	H
5	xyl	glu	glu

2. 达玛烷型

达玛烷(dammarane,**6**)型四环三萜结构特点是 C-8 位有角甲基,且为β-构型。此外,还有 C-13β-H,C-10β-甲基,C-14α-甲基,C-17 位有β-侧链,C-20 构型有 *R* 或 *S* 两种可能。

五加科著名植物药材人参(*Panax ginseng*)和三七(*P. notoginseng*)中的活性皂苷的真实皂苷元原人参二醇(**7**)和原人参三醇(**8**)均为达玛烷型四环三萜。原人参二醇和原人参三醇的结构很相似,仅后者比前者多了一个 6α-OH。大部分这类人参皂苷中 C-20 的构型为 *S*,近来也分离得到 C-20 为 *R*-构型的人参皂苷。具有达玛烷型苷元的皂苷在所有三萜皂苷中所占的比例仅次于齐墩果烷型三萜皂苷。在具有达玛烷型苷元的人参皂苷中,糖链可连接于 3-位、6-位及 20-位,如人参皂苷 Rb_1(**9**)即为在苷元的 3-位及 20-位分别连有两个葡萄糖单元构成的糖链。

6

7 $R=H,R_1=R_2=H$
8 $R=OH,R_1=R_2=H$
9 $R=H,R_1=glu(1\text{-}2)glu,R_2=glu(1\text{-}6)glu$

3. 葫芦烷型

葫芦烷(cucurbitane,**10**)型三萜是一类通常具有苦味及高氧化程度的四环三萜。葫芦烷型三萜 A/B 环上的取代和羊毛甾烷型不同,有 C-8β-H,C-9β-CH_3,C-10α-H,其余与羊毛甾烷一样。

葫芦烷型三萜主要存在于葫芦科植物,该类型三萜具有细胞毒、抗肿瘤、保肝及抗炎等生物活性。由葫芦科雪胆属植物(*Hemsleya amabilis*)的根中分出雪胆甲素(cucurbitacin Ⅱa,**11**)和雪胆乙素(cucurbitacin Ⅱb,**12**),临床试用于治疗急性痢疾、肺结核、慢性气管炎,均取得较好疗效。葫芦烷型三萜在植物中主要以糖苷的形式存在,如芮和恺等报道从贵州产圆果雪胆(*Hemsleya amabilis* Diels)中获得一种新的苦味质——雪胆甲素苷(**13**)[25]。如果植物中存在β-葡萄糖酶,葫芦烷型三萜皂苷则难以以原来形式分离得到。

10

11 R=H,R′=Ac
12 R=R′=H
13 R=glu,R′=Ac

4. 苦楝素型

苦楝素(meliacane,**14**)型三萜化合物结构骨架由 26 个碳构成,又称四去甲三萜(tetranortriterpenoid)。苦楝素型三萜化合物大量存在于楝科楝属植物中,具有苦味及昆虫拒食作用,苦楝果实提取物作昆虫拒食剂已商品化。从楝科植物川楝(*Melia toosendan*)的果实、根皮、树皮等部位获得的川楝素(toosendanin,**15**)被用作驱蛔虫药,有效率在 90%以上。从印楝(*Azadirachta indica*)种子中分得的印楝素(azadirachtin,**16**)具有极强的昆虫拒食作用,昆虫蜕皮及生长抑制作用。以印楝素为主要活性成分的印楝果实提取物已被开发成抵御昆虫侵害的农药。该化合物的结构最初曾被误定,后 W. Kraus 等修正了其结构[26]。苦楝素型三萜化合物骨架氧化程度高,许多结构较复杂,需利用单晶 X 射线衍射获得确定。Sawabe 等报道从植物 *Citrus unshiu* 的果皮中分得一些苦楝素型三萜糖苷,如 methyl nomilinate 17-*O*-β-D-glucopyranoside(**17**)[27]。

14　　**15**

16　　**17**

5. 苦木苦素型

苦木苦素(quassinane,**18**)类化合物的基本骨架为苦木烷,分子结构中具有 20 个碳。以往认为该类成分属于二萜类化合物,现发现该类化合物是由阿朴大戟醇(**19**)或其差向异构体阿朴甘遂醇(**20**)按下列途径形成三种分别具有 25 个碳,20 个碳和 19 个碳的不同碳架,大多数苦木苦素类化合物具有 20 个碳的苦木烷骨架。

18

19(20*R*)
20(20*S*)

C25

C20　　C19

张金生等曾从中药鸦胆子(*Brucea javanica*)中分离出许多该类成分[28,29]。从鸦胆子中获得的鸦胆亭(bruceantin,**21**)等成分具有显著抗癌活性,但由于该类

化合物毒性大,限制了其临床应用。对苦木苦素类化合物的全合成研究也有很多报道[30,31]。具有苦木苦素骨架的糖苷有从印度尼西亚植物 *Quassia indica* 分得的 C_{19} 苦木苦素糖苷 2-*O*-glucosylsamaderine(**22**)[32] 及从鸦胆子(*Brucea javanica*)中分离得到的鸦胆子素 E 2-*O*-β-D-葡萄糖苷(**23**)[33]。

21

22

23

(二) 五环三萜类

1. 齐墩果烷型

齐墩果烷(oleanane,**24**)型三萜又称β-香树脂烷(β-amyrin)型三萜。结构中 5 个环都为六元环,A/B、B/C 和 C/D 环为反式排列,D/E 环为顺式排列。8 个甲基分别取代在 C-4,C-4,C-8,C-10,C-14,C-17,C-20 和 C-20。该类三萜在植物界分布十分广泛。

游离的齐墩果酸(oleanolic acid,**25**)广泛存在于木犀科齐墩果(*Olea europaea*)及女贞(*Ligustrum lucidum*)等植物中,具有降转氨酶作用,临床用于治疗急性黄疸型肝炎。豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)中存在的甘草次酸(glycyrrhetinic acid,**26**)及甘草酸(glycyrrhizic acid,**27**)也具有齐墩果烷骨架,两者都有促肾上皮质激素(ACTH)样生物活性,临床用于抗炎药,并用于治疗胃溃疡。

24

25

26 R=H
27 R=gluA(1-2)gluA

具有齐墩果烷型苷元的皂苷是最为常见的一类三萜皂苷，有很大一部分苷元都具有 3–位羟基、$\Delta^{12,13}$ 双键和 28–位羧基取代。

2. 乌索烷型

乌索烷（ursane，**28**）型三萜又称 α–香树脂烷（α–amyrin）型三萜。同齐墩果烷型三萜一样，结构中 5 个环都为六元环，A/B、B/C 和 C/D 环为反式排列，D/E 环为顺式排列。8 个甲基分别取代在 C–4，C–4，C–8，C–10，C–14，C–17，C–19 和 C–20。

具有乌索烷型骨架的游离三萜及三萜糖苷在植物中存在也较普遍。该类皂苷中的糖链一般也都是通过苷元的 3–位羟基及 28–位羧基与苷元相连。植物积雪草（*Centella asiatica*）中存在含量较高的积雪草苷（asiaticoside，**29**），该化合物是积雪草的主要有效成分，具有促进伤口愈合等作用。

28　　**29**

3. 羽扇豆烷型

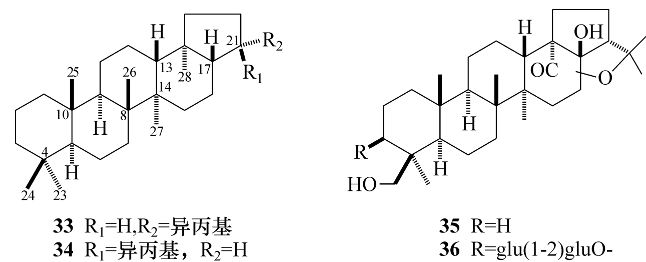
羽扇豆烷（lupane，**30**）型三萜结构中 E 环为五元碳环，且在 E 环 C–19 位有异丙基以 α–构型取代，A/B、B/C、C/D 以及 D/E 环都为反式排列。

三萜化合物桦皮酸（betulinic acid，**31**）具有羽扇豆烷骨架，存在于桦树皮、石榴树皮及叶、酸枣仁和天门冬等植物中，该化合物具有抗 HIV 作用，且对肿瘤细胞具有选择性的细胞毒作用[34]。叶文才等从中药白头翁（*Pulsatilla chinensis*）中分离得到一苷元为羽扇豆烷骨架的三萜皂苷 pulsatilloside C（**32**）[35]。

30 **31** **32**

4. 何伯烷型和异何伯烷型

何伯烷(hopane,**33**)型和异何伯烷(isohopane,**34**)型三萜结构中E环为五元碳环,且在E环C-21位有异丙基取代,A/B、B/C、C/D以及D/E环都为反式排列。何伯烷型和异何伯烷型三萜结构差别在于C-21位异丙基的构型不同,前者为α-构型,后者为β-构型。Tanaka等和Inatomi等分别报道从蕨类植物*Diplazium subsinuatum*中分得具有何伯烷型骨架的三萜内酯17,24-dihydroxyhopan-28,22-olide(**35**)及三萜糖苷diplazioside Ⅵ(**36**)[36,37]。



33 R_1=H,R_2=异丙基
34 R_1=异丙基,R_2=H

35 R=H
36 R=glu(1-2)gluO-

三、三萜结构的波谱解析

(一) 紫外光谱

大多数三萜类化合物结构中不具有共轭结构,紫外光谱不显示强的特征吸收峰。苦楝素类化合物结构中的呋喃环和一些三萜化合物结构中存在的α-、β-不饱和羰基等官能团在紫外光谱中会产生特征吸收峰。在鉴定三萜化合物的结构时,如果分子中存在两个或两个以上不饱和基团,可利用紫外光谱帮助确定这些基团

是否处于共轭位置。

(二) 红外光谱

根据一些三萜类化合物在红外光谱区域 A(1355~ 1392cm^{-1})和区域 B(1245~ 1330cm^{-1})的碳氢吸收可区别齐墩果烷型、乌索烷型和四环三萜。齐墩果烷型三萜在区域 A 有 2 个峰(1392~ 1379cm^{-1}, 1355~ 1370cm^{-1});区域 B 有 3 个峰(1315~ 1330cm^{-1},1299~ 1306cm^{-1},1250~ 1269cm^{-1})。乌索烷型三萜在区域 A 有 3 个峰(1386~ 1392cm^{-1},1370~ 1383cm^{-1},1359~ 1364cm^{-1});在区域 B 也有 3 个峰(1308~ 1312cm^{-1},1270~ 1276cm^{-1},1245~ 1250cm^{-1})。四环三萜在区域 A 和 B 都只有 1 个峰。

(三) 质谱

在 EI 质谱中,五环三萜类化合物的质谱裂解具有一定规律。当分子中存在环内双键时,一般都有较特征的 RDA 裂解;如果无环内双键时,常常从 C 环处断裂为两个碎片;在有些情况下,可以同时产生 RDA 断裂和 C 环断裂。根据以上规律分析所产生碎片的质量数,可帮助判断取代基所在的部位。四环三萜类化合物的裂解特征是先失去边链。

(四) 核磁共振谱

自 20 世纪 80 年代起,高兆周核磁共振仪器及二维核磁共振谱在天然产物研究中获得普遍应用。利用这些仪器和技术,人们已能对三萜结构中的每个氢及碳信号进行从头归属,这不仅确保了结构鉴定的准确性,还大大提高了结构鉴定速度。

三萜类化合物氢谱中容易辨别的信号有甲基质子信号、双键质子信号及连氧碳上的质子信号等。齐墩果烷型三萜氢谱中的甲基信号都为单峰;乌索烷型三萜、四环三萜氢谱中常可观察到双峰甲基信号;羽扇豆烯型三萜的 C-30 烯丙甲基一般位于 δ1. 63~ 1. 80ppm,且呈宽的单峰。三萜环内双键质子的 δ值一般大于 5 ppm,如齐墩果酸和乌索酸类的 C-12 双键质子在 δ4. 93~ 5. 50ppm。环外双键质子的化学位移一般小于 5ppm,如羽扇豆烯和何伯烯型的 C-29 位两个同碳烯氢信号出现在 δ4. 30~ 5. 00ppm。对于大多数四环及五环三萜类化合物,C-3 位有羟基取代,因 C-4 一般为季碳,如 C-2 位无取代基团时,H-3 表现为 dd 峰。根据 C-3 位质子的偶合常数可判断 C-3 位羟基的相对构型。对于甾体类化合物,C-3 位也常有羟基取代,但因其结构中 C-4 位两个氢也与 H-3 有偶合,使 H-3 在氢谱中表现为 dddd 峰,由此常可容易地将三萜与甾体化合物区分。

与核磁共振氢谱相比,核磁共振碳谱信号分布在更广泛的范围,信号重叠程度

大大降低。虽然利用现代二维核磁共振技术已能将三萜化合物结构中每个氢及碳信号进行完全归属,但将所获得化合物的碳谱数据与已知化合物碳谱数据进行比较,仍是解析三萜化合物结构的一个快速、简便的工具。Mahato 等归纳了 396 个具有各类骨架的五环三萜化合物的碳谱数据[38];Kalinovskii 和 Agrawal 分别对齐墩果烷型三萜的碳谱数据进行了整理[39,40];Ageta 和 Chakravarty 报道了一些准确归属的何伯烷的碳谱数据[41,42];左国营等综述了碳谱化学位移在达玛烷型三萜皂苷元结构研究中的应用[43]。

第六节 甾体皂苷

甾体皂苷是以 C-27 甾体化合物为苷元的一类皂苷,主要分布于百合科、薯蓣科和茄科植物中,其他科如玄参科、石蒜科、豆科、鼠李科的一些植物中也含有甾体皂苷,常用中药知母、麦冬、七叶一枝花等都含有大量的甾体皂苷。甾体皂苷元是医药工业中生产黄体酮、性激素及皮质激素的重要原料。

一、甾体皂苷元

最常见的甾体皂苷元是螺旋甾烷(spirostane,**37**)的衍生物,在其侧链上有一特征的螺旋缩酮结构。天然存在的螺旋甾烷存在 C-5 和 C-25 两类差向异构体,其他手性碳的构型是不变的。

37

螺旋甾烷的侧链上有 C-20、C-22 和 C-25 三个手性中心,其中 C-20 和 C-22 分别为 *S*-和 *R*-构型,C-25 产生的异构体在植物界广泛存在。这两种异构体可相互转化,菝契皂苷元在盐酸乙醇溶液中异构成异菝契皂苷元。菝契皂苷元 C-25 甲基为直立键,而异菝契皂苷元中 C-25 甲基为平伏键,因而前者的稳定性比后者差,在酸性乙醇中异构化时,平衡倾向于异菝契皂苷元一边。在习惯上,这种差向异构体是以较不稳定的一个命名,较稳定的异构体则加上字头“异”。根据系统命名原则,这两个差向异构体则是用 25*S*-或 25*R*-标出相应螺旋甾烷 C-25 的绝对构型来区别。例如,菝契皂苷元可称为 25*S*-5β-螺旋甾-3β-醇。

25*S* $\xrightleftharpoons{H^+}$ 25*R*

薯蓣皂苷元(diosgenin,**38**)在乙酐中回流得到F环开环的二乙酰伪薯蓣皂苷元(pseudodiosgenin diacetate,**39**),再用三氧化铬氧化,消除β-酰氧基得到3β-乙酰氧基-孕甾-5,16-二烯-20-酮(3-acetoxy-pregna-5,16-dien-20-one,**40**),进一步可得孕酮[44]。这种降解对其他甾体皂苷元同样适用,它是大规模合成孕酮以及性激素、皮质激素的基础。

HO **38** $\xrightarrow{Ac_2O}$ AcO OAc **39**

$\xrightarrow{CrO_3}$ AcO OAc $\xrightarrow{OH^- 或 H^+}$ AcO **40**

二、甾体皂苷元结构的波谱解析

(一) 紫外光谱

饱和的甾体皂苷元在200~400nm间无吸收,如果结构中引入孤立双键、羰基、α,β-不饱和酮基或共轭双键,则可产生吸收。含孤立双键的甾体皂苷元在205~225nm有吸收(ε 900左右),含羰基的甾体在285 nm有一弱吸收(ε 500)。具有α,β-不饱和酮基的甾体在240nm处有特征吸收(ε 11 000),共轭双烯在235nm有吸收。

(二) 红外光谱[45,46]

含有螺缩酮结构侧链的甾体皂苷元在红外光谱中几乎都显示980cm^{-1}(A)、

$920cm^{-1}$(B)、$900cm^{-1}$(C)和 $860cm^{-1}$(D)附近的 4 个特征吸收谱带，且 A 带最强。在(25*S*)-型甾体皂苷或皂苷元中，B 带 > C 带，在(25*R*)-型甾体皂苷或皂苷元中则是 B 带 <C 带，据此可区别 C-25 位两种立体异构体。

(三) 质谱[47]

甾体皂苷元由于分子中有螺甾烷侧链，其 EI 质谱中出现很强的 *m/z* 为 139 的基峰，中等强度的 *m/z* 为 115 的碎片离子峰及弱的 *m/z* 为 126 的辅助离子峰。这些峰的裂解途径可解释如下

a
b
麦氏重排
或
*m/z*139
*m/z*126
*m/z*115

如果 C-25 或 C-27 位有羟基取代，这 3 个峰质量均上移 16 amu，即为 *m/z* 155、*m/z*131 及 *m/z*142。如果 C-25、C-27 位有双键取代，这 3 个峰均下移 2 amu，即为 *m/z*137、*m/z*113 及 *m/z*124。但 C-23 位有 OH 取代的皂苷元，其 *m/z*139 基峰消失，也没有质量位移的相应峰。

(四) 核磁共振谱

甾体皂苷元在 ^{1}H-NMR 谱高场区有 4 个甲基(即 18-、19-、21-和 27-位甲基)质子的特征峰，其中 18-、19-位甲基均为单峰，且前者处于较高场。21-、27-位甲基均为双峰，且后者处于较高场。如果 25-位有 OH 取代，则 27-位甲基成为单峰，并向低场位移。16-和 26-位上的氢为连氧碳上的质子，处于较低场。以上质子容易辨认，而其他碳原子上氢的化学位移相近，难于识别。

27-位甲基的化学位移值还因其构型不同而有区别。甲基为 α-取向[平伏键，(25*R*)-构型]的化学位移值要比 β-取向[直立键，(25*S*)-构型]处于高场，因此可利用 27-位甲基的化学位移值来区别 25*R* 和 25*S* 两种异构体。甾体皂苷元 25*R* 和 25*S* 异构体在 ^{1}H-NMR 谱中的区别还表现在 C-26 位两个氢的化学位移差别。在

25*R* 异构体中，C–26 位两个氢的化学位移相似；在 25*S* 异构体中，两个氢的化学位移差别较大[48]。

与信号重叠十分严重的甾体皂苷元的^{1}H–NMR 谱相比，甾体皂苷元分子中的 27 个碳信号在^{13}C–NMR 谱中可得到很好的辨认。迄今已有许多甾体皂苷元及甾体皂苷的^{13}C–NMR 数据综述报道[49~51]。在获得一甾体皂苷后，通过与有关文献报道数据进行比较，并参考取代基对化学位移的影响，基本可推知甾体皂苷元的结构。

三、螺旋甾烷类皂苷

螺旋甾烷类化合物通常是以 C–3 位的羟基与糖结合生成皂苷，其他位置如 C–1、C–2、C–5、C–11 位的羟基有时也被苷化。近年来从植物中分得许多 C–26 位羟基苷化的皂苷，这些皂苷由于 F 环开环，性质上较为独特，因而把它们与螺旋甾烷类皂苷分开，放在后面讨论。

薯蓣属（*Dioscorea*）是薯蓣科中最大的一个属，其中大多数植物都含有甾体皂苷。20 世纪 30 年代中期，藤井胜也、塚本赳夫等从山萆薢（*D. tokoro*）中分出了该属的第一个甾体皂苷元——薯蓣皂苷元（**38**）之后，由于用简单而经济的方法将薯蓣皂苷元转化为甾体激素获得成功，薯蓣皂苷元成为合成激素药物的重要原料。朱任宏教授在国内首次从川萆薢（*D. septemloba*）中分出了薯蓣皂苷元，开创了我国甾体皂苷研究的先河。迄今从薯蓣属植物中已分得大量甾体皂苷。盾叶薯蓣（*D. zingiberensis*）和穿龙薯蓣（*D. nirponica*）是国内生产薯蓣皂苷元的主要原料，前者的干燥茎中主要含三种皂苷：延令草次苷（trillin，**41**）、纤细皂苷（gracillin，**42**）和薯蓣皂苷元双葡萄糖苷（diosgenin diglucoside，**43**）[52]。后者的主要甾体皂苷成分为薯蓣皂苷（dioscin，**44**）和纤细皂苷[53]。蜀葵叶薯蓣（*D. althaeoides*）中薯蓣皂苷元的含量较高，资源也较丰富，具有潜在的经济价值，它所含的甾体皂苷主要也是薯蓣皂苷和纤细皂苷[54]。

RO

41　R = D–glu

42　R = D–glu $\overset{1\quad 3}{—}$ D–glu–（2←1 L–rha）

43　R = D–glu $\overset{1\quad 4}{—}$ D–glu–

44　R = L–rha $\overset{1\quad 2}{—}$ D–glu–（4←1 L–rha）

四、呋喃甾烷类皂苷

研究表明,一些螺旋甾烷类皂苷在新鲜的植物中实际上并不存在,而是在植物的干燥、储存过程中产生的,它们的原皂苷是 F 环开环后,26-位羟基苷化形成的呋喃甾烷型皂苷。呋喃甾烷型皂苷在早期的工作中没有发现,其原因一方面是原皂苷的极性大难以分离,另一方面由于没有认识到植物体内的酶对原皂苷的水解作用,以致在分离之前原皂苷已被转化为相应的次皂苷。对一些植物的重新研究表明这类原皂苷在含甾体植物的体内是普遍存在的。

薯蓣属植物中含有多种次皂苷。对新鲜的盾叶薯蓣(*D. zingiberensis*)研究表明,其中主要含有两种呋喃甾烷类原皂苷,原盾叶皂苷(protozingberenssaponin,**45**)和原纤细皂苷(protogracillin,**46**),而在干燥的盾叶薯蓣中仅分离得到 3 个次皂苷[55]。

五、呋喃螺旋甾烷类皂苷

呋喃螺旋甾烷(furospirostane)类皂苷的数量很少,它与螺旋甾烷类皂苷不同之处是其苷元的 F 环是呋喃环,而不是吡喃环。从新鲜的茄属植物颠茄(*Solanum aculeatissimum*)中分离得到的颠茄皂苷 A 和 B[aculeatiside A(**47**)和 B(**48**)]是纽阿替皂苷元(**49**)的双糖链苷。酸水解时除得到 **49** 外,还得到其 F 环异构产物异纽阿替皂苷元(**50**)。利用 Baeyer-Villiger 降解,可得到 **51** 及(*S*)-4,5-二羟基戊酸-5-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷(**52**),证明苷元的 C-26 羟基上仅连有一个葡萄糖[56]。

47 R= glu $\frac{2\ 1}{}$ rha (4→1 rha)

48 R= glu $\frac{2\ 1}{}$ glu (3→1 rha)

H^+ → 49 + 50

$HCOOH/H_2O_2$ → 51 + 52

参　考　书　目

[1] 徐任生,叶阳,赵维民. 天然产物化学(第二版). 北京:科学出版社,2004

[2] 姚新生. 天然药物化学(第二版). 北京:人民卫生出版社,1997

[3] Waller G R et al. Saponins Used in Food and Agriculture. New York:Plenum Press,1996

[4] Waller G R et al. Saponins Used in Traditional and Modern Medicine. New York:Plenum Press,1996

参　考　文　献

[1] Zhao W M et al. J Nat Prod, 1994, 57:1613

[2] Diallo B et al. J Chromatogr, 1991, 558:446

[3] Smith F et al. Methods in Carbohydr Chem, 1965, 5:361

[4] 孔繁华等. 化学学报, 1988, 46:775

[5] Hara S et al. Chem Pharm Bull, 1987, 35:501

[6] Agrawal P K. Phytochem, 1992, 31:3307

[7] Massiot G et al. J Chem Soc,Chem Commun, 1986, 1485

[8] Bothnerby A A et al. J Am Chem Soc, 1984, 106:811

[9] Rao A V et al. Drug Metab Drug Interact, 2000, 17:211

[10] 香港科技大学生物技术研究所. 中药研究与开发综述. 见:生物技术研究所访问学者文集. 北京:科学出版社, 2000:255

[11] Kong F H et al. Tetrahedron Lett, 1986, 27:5765

[12] Yu L et al. Planta Medica, 1994, 60:204

[13] Kim W et al. Koryo Insam Hakhoechi, 1989, 13:24
[14] Kensil C R et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 405:165
[15] 鞠佃文等. 药学学报, 1994, 29:252
[16] 李静波等. 中草药, 1992, 23:249
[17] Takechi M et al. Phytochem, 1990, 29:451
[18] 黄聪等. 中国药理学通报, 1991, 7:190
[19] 李麟仙等. 中国药理学通报, 1991, 1:56
[20] 高宝英等. 药学学报, 1992, 27:641
[21] 雷春利等. 白求恩医科大学学报, 1994, 20:326
[22] 唐世蓉等. 植物学报, 1983, 25:556
[23] Bedir E et al. Biol Pharm Bull, 2000, 23:834
[24] 姚新生. 天然药物化学(第二版). 北京:人民卫生出版社, 1997:327
[25] 芮和恺等. 药学学报, 1981, 6:445
[26] Kraus W et al. Tetrahedron Lett, 1985, 26:6435
[27] Sawabe A et al. Carbohydr Res, 1999, 315:142
[28] 张金生等. Planta Medica, 1980, 39:265
[29] 张金生等. 化学学报, 1984, 42:684
[30] Vanderroest J M et al. J Am Chem Soc, 1993, 115:5841
[31] Grieco P A et al. J Am Chem Soc, 1994, 116:7606
[32] Kitagawa I et al. Chem Pharm Bull, 1996, 44:2009
[33] Fujioka T et al. J Nat Prod, 1994, 57:243
[34] Zuco V et al. Cancer Lett, 2002, 175:17
[35] Ye W et al. J Nat Prod, 1998, 61:658
[36] Tanaka N et al. Chem Pharm Bull, 1982, 30:3632
[37] Inatomi Y et al. Chem Pharm Bull, 2000, 48:1930
[38] Mahato S B et al. Phytochem, 1994, 37:1517
[39] Kalinovskii A I. Chem Nat Compd (Engl Transl), 1992, 28:1
[40] Agrawal P K et al. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 1992, 24:1
[41] Ageta H et al. Chem Pharm Bull, 1994, 42:39
[42] Chakravarty A K et al. Tetrahedron, 1994, 50:2865
[43] 左国营等. 有机化学, 1997, 17:385
[44] (a) Marker R E et al. J Am Chem Soc, 1939, 61:3592
(b) Marker R E et al. J Am Chem Soc, 1940, 62:518, 648, 898, 2532
[45] Rolandeddy C et al. Anal Chem, 1953, 25:266
[46] Jones R N et al. J Am Chem Soc, 1953, 75:158
[47] Djerassi C et al. Org Mass Spectr, 1970, 3:1187
[48] Williams D H et al. Tetrahedron, 1965, 21:1841
[49] Garcia J A R et al. Magn Reson Chem, 1987, 25:831

[50] 杨仁洲等. 云南植物研究, 1987, 9:374
[51] Agrawal P K et al. Phytochem, 1985, 24:2479
[52] 刘承来等. 植物学报, 1984, 26:283
[53] 方一韦等. 药学学报, 1982, 17:388
[54] 刘承来等. 药学学报, 1984, 19:799
[55] 刘承来等. 植物学报, 1985, 27:68
[56] Saijo R et al. Phytochem, 1983, 22:733

第十章　氨基酸和肽

在生命活动中有三类物质起着重要作用,即多糖、蛋白质和核酸。从化学上讲这三类物质都是高聚物。在这三类生物高分子中,蛋白质最具生理活性多样性。它存在于所有细胞中,是生物体各种组织如皮肤、肌肉、骨骼、神经和血液等的重要组成物质。作为酶和激素的蛋白质,它们催化和调节机体内的众多反应;作为抗体,它又能抵御病菌的侵入。各种不同蛋白质又各具特殊功能,如血红蛋白,它可将维持生命的最重要物质——氧送到机体各个角落。

蛋白质是多聚酰胺,是由氨基酸组成的。组成蛋白质的氨基酸通常有 20 种,称之为天然氨基酸,都为 L-型 α-氨基酸。蛋白质是复杂的生物高分子,相对分子质量通常都在 10 000 以上,如胰岛素的相对分子质量为 6000,但它的二聚体的相对分子质量为 12 000,同时具有复杂的高级结构,所以胰岛素可视为最小的蛋白质。从结构上讲,肽与蛋白质没有什么区别,肽也是由氨基酸以酰胺键组成,也同样具有较稳定的空间结构,只不过分子较蛋白质小。肽也具有多样的和复杂的生理功能,它在生物体内传递信息、调节细胞代谢活动和协调各机体的生理过程,在生命活动中起着非常重要的作用。本章对氨基酸和肽做简要介绍。

第一节　氨　基　酸

一、结构与分类

表 10－1 所列的 20 种氨基酸为构成蛋白质的氨基酸,称之为蛋白质组分氨基酸,也即通常意义上的天然氨基酸。它们都是 α-氨基酸。按照所含侧链 R 基团的性质不同,又分为中性、酸性和碱性三类。其中除甘氨酸外,它们的 α-碳原子都为 L 构型,即与 L-甘油醛有同样构型。

COO^- ; $H_3\overset{+}{N}$—C—H ; R

L-氨基酸

CHO ; HO—C—H ; CH_2OH

L-甘油醛

CH_2COO^- ; $\overset{+}{N}H_3$

甘氨酸

按照 Cahn-Ingold-Prelog 规则,α-氨基酸中侧链基团 R 都较 COOH 的优先性较低。因此,通常大多数 L-氨基酸也即为 *S*-构型。

迄今为止,在天然蛋白质中只发现 L-氨基酸,但是在自然界也发现了 D-氨基

酸。例如,在哺乳动物的前脑中发现有 D–丝氨酸,而在神经末梢存在 D–天冬氨酸[1]。在低等的非脊椎动物如两栖类动物,蛙、喇蛄及龙虾中都发现有 D–氨基酸。其中,最具重要意义的是 1981 年在蛙皮肽(dermorphin)中发现 D–丙氨酸[2]。同样,在海洋生物和微生物中都发现 D–氨基酸的存在,如在缬氨霉素(valinomycin)、tyrocidine、短杆菌肽(gramicidine S)等中都发现 D–氨基酸[1]。

除了蛋白质氨基酸之外,还存在非蛋白质组分氨基酸。由于生物体内缺乏特异的转移 RNA 和三联密码,这些氨基酸不能直接用于合成蛋白质,也不能由蛋白质氨基酸通过翻译后修饰(post translational modification)产生。因此,这些氨基酸未能在蛋白质链中发现。非蛋白质氨基酸的结构是多变的,分布也非常广泛,从植物中发现的非蛋白质氨基酸有 240 多种[3],大多数是多官能饱和脂肪族氨基酸,如 2,6–二氨基庚二酸(2,6–diaminopimelic acid,**1**)为中性氨基酸,而 4–羧基–4–羟基–2–氨基己二酸(**2**)则为酸性氨基酸。

$$HOOC—\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}—(CH_2)_3—\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}—COOH$$

1

$$HOOC—CH_2—\overset{OH}{\overset{|}{\underset{COOH}{\underset{|}{C}}}}—CH_2—\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}—COOH$$

2

表 10-1　天然氨基酸

侧链 R 的结构	名　称	缩写	pK_{α_1} (α–COOH)	pK_{α_2} (α–NH3)	pK_{α_3} (RGROUP)	pI
中性氨基酸						
—H	甘氨酸(glycine)	G 或 Gly	2.3	9.6		6.0
$—CH_3$	丙氨酸(alanine)	A 或 Ala	2.3	9.7		6.0
$—CH(CH_3)_2$	缬氨酸(valine)	V 或 Val	2.3	9.6		6.0
$—CH_2CH(CH_3)_2$	亮氨酸(leucine)	L 或 Leu	2.4	9.6		6.0
$—CH\ CH_3CH_2CH_3$	异亮氨酸(isoleucine)	I 或 Ile	2.4	9.7		6.1
$—CH_2C_6H_5$	苯丙氨酸(phenylalanine)	F 或 Phe	1.8	9.1		5.5
$—CH_2CONH_2$	天冬酰胺(asparagine)	N 或 Asn	2.0	8.8		5.4
$—CH_2CH_2CONH_2$	谷酰胺(glutamine)	Q 或 Gln	2.2	9.1		5.7
$—CH_2C_8H_5NH$	色氨酸(tryptophan)	W 或 Trp	2.4	9.4		5.9
$HOOC—CHCH_2CH_2CH_2NH$	脯氨酸(proline)	P 或 Pro	2.0	10.6		6.3
$—CH_2OH$	丝氨酸(serine)	S 或 Ser	2.2	9.2		5.7
$—CHOHCH_3$	苏氨酸(threonine)	T 或 Thr	2.6	10.4		6.5
$—CH_2—C_6H_4—OH$	酪氨酸(tyrosine)	Y 或 Tyr	2.2	9.1	10.1	5.7
$HOOC—CHCH_2CHOHCH_2NH$	羟脯氨酸(hydroxyproline)	Hyp	1.9	9.7		6.5

续表

侧链 R 的结构	名　称	缩写	pK_{α_1} (α–COOH)	pK_{α_2} (α–NH_3)	pK_{α_3} (RGROUP)	pI
—CH_2SH	半胱氨酸(cysteine)	C 或 Cys	1.7	10.8	8.3	5.0
—CH_2—S 　　| CH_2—S	胱氨酸(cystine)	Cys–Cys	1.6 2.3	7.9 9.9		5.1
—$CH_2CH_2SCH_3$	甲硫氨酸(methionine)	M 或 Met	2.3	9.2		5.8
酸性氨基酸						
—CH_2COOH	天冬氨酸(aspartic acid)	D 或 Asp	2.1	9.8	3.9	3.0
—CH_2CH_2COOH	谷氨酸(glutamic acid)	E 或 Glu	2.2	9.7	4.3	3.2
碱性氨基酸						
—$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$	赖氨酸(lysine)	K 或 Lys	2.2	9.0	10.5	9.8
—$CH_2CH_2CH_2NHCNHNH_2$	精氨酸(arginine)	R 或 Arg	2.2	9.0	12.5	10.8
—$CH_2C_3N_2H_3$	组氨酸(histidine)	H 或 His	1.8	9.2	6.0	7.6

除了链状的脂肪族氨基酸之外,还存在杂环氨基酸。例如,从真菌分离得到的3–chloro–5–keto–3,4–pyrrolidene–2–car–boxylic acid (**3**)[4];从海绵体(*Sponge tedamia anhelans*)中分离得咪唑衍生物(**4**)[5];从微生物(*Streptomyces* KCTC9303)中分离得到一种新的细胞毒亚氨酸 4–methylaeruginoic acid[6]。

3　　**4**

非蛋白质氨基酸在植物中的广泛分布,如β–丙氨酸与γ–氨基丁酸(GABA),可能是由于它们与蛋白质氨基酸及其他伯胺的代谢密切相关。

上述这些蛋白质氨基酸或非蛋白质氨基酸都是天然存在的。还有一类氨基酸完全是化学合成的,用来在结构上模拟天然氨基酸。用它们作为单元合成肽类化合物,能保持或增加生理功能,现在广泛地用于合成肽类药物。其中有代表性的如萘基丙氨酸(naphthylalanine,Nal)、吡啶基丙氨酸(pyridyl alanine,Pal)、四氢异喹啉羧酸(1,2,3,4–tetrahydroisoquinoline–3–carboxylic acid,Tic)、噻吩丙氨酸[β–(2–thienyl)alanine,Thi]及环己基丙氨酸(β–cyclohexylalanine,Cha)等。这些非天然氨基酸都被广泛地用于合成多肽药物,如促黄体激素释放激素(LHRH)的拮抗剂、一些酶如肾素(renin)及 HIV 中的蛋白水解酶的抑制剂。

二、氨基酸的物理性质

氨基酸含有碱性基团（—NH_2）和酸性基团（—COOH），在固体状态下是以两性离子(dipolar ion 或 zwitterion)存在，在水溶液中形成平衡，既可以作为酸，也可以作为碱，既可以是质子供体，又可以是质子受体，反应式如下

$$\underset{\text{R}}{H_3\overset{+}{N}\underset{|}{C}HCOOH} \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{R}}{H_3\overset{+}{N}\underset{|}{C}HCOO^-} \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{R}}{H_2N\underset{|}{C}HCOO^-}$$

阳离子形式　　两性离子　　阴离子形式

（在酸性介质中）　　（在碱性介质中）

氨基酸的电离性质用 K_a 值（或 pK_a 值）表示，pK_a 为宏观的解离常数，可从滴定曲线中求得。pK_a 表示了相对的质子供给能力，每一种氨基酸的可解离基团都有一特定的 pK_a 值。习惯上将酸性最强的解离常数编号为 pK_{a_1}，以后依次为 pK_{a_2}、pK_{a_3} 等。通常 α-COOH 为最强的质子供给体，为 pK_{a_1}；β-COOH 为 pK_{a_2}，α-NH_3^+ 为 pK_{a_3}。例如，天冬氨酸的 pK_{a_1} 为 2.10；pK_{a_2} 为 3.86；pK_{a_3} 为 9.83。

每一种氨基酸都有一个叫做等电点(isoelectric point，pI)的介质 pH，此时氨基酸呈电中性，即由羧基解离产生的负电荷与处于完全质子化的基团（—N^+H_3）的正电荷平衡。此时分子仍处于解离状态，但净电荷等于零，在电场中不移动。例如，从甘氨酸的滴定曲线，可测得它的 pK_{a_1} 为 2.34，pK_{a_2} 为 9.69，因此它的 pI 值可按下式算出为 6.02。

$$pI = 1/2(pK_{a_1} + pK_{a_2})$$

对于一个分子中存在两个以上的解离基团的氨基酸，如 Asp、Glu、Lys 等，即有两个以上的 pK_a 值时，其 pI 值应为在其两性离子附近的 pK_a 的平均值。以 Lys 为例，其 pI 应为

$$\frac{pK_{a_2} + pK_{a_3}}{2} = \frac{9.0 + 10.5}{2} = 9.8$$

$$\underset{\overset{+}{N}H_3}{H_3\overset{+}{N}(CH_2)_4\underset{|}{C}HCOOH} \underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} \underset{\overset{+}{N}H_3}{H_3\overset{+}{N}(CH_2)_4\underset{|}{C}HCOO^-} \underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} \underset{NH_2}{H_3\overset{+}{N}(CH_2)_4\underset{|}{C}HCOO^-}$$

$pK_{a_1} = 2.2$　　$pK_{a_2} = 9.0$

$$\underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} \underset{NH_2}{H_2N(CH_2)_4\underset{|}{C}HCOO^-}$$

$pK_{a_3} = 10.5$

两性离子

三、氨基酸的化学性质

氨基酸中所含有的基团,如氨基、羧基和侧链基团都能发生相应的化学反应,如羧基的离解,形成酯及酸的反应;氨基的酰化、卤化及重氮化等反应;侧链基团 R 则根据不同种类而有不同的反应,如半胱氨酸侧链 SH 的烷基化与氧化等。氨基酸的最重要性质是形成酰胺键合成肽(见第二节)。

(一) 酰化反应

在酸性条件下,酰卤与氨基酸反应得到 *O*-酰化物,在弱碱条件下,可得 *N*, *O*-二酰化物,而在强碱条件下只得到 *N*-酰化物。在碱性条件下,制备 *N*-酰化衍生物用以保护氨基是合成多肽的重要步骤(见第二节)。

酰化反应也是鉴定氨基酸的方法之一。例如,氨基酸的氨基与丹磺酰氯(dansyl chloride, DNS-Cl)反应得到 DNS-氨基酸,产物的荧光很强,可用于氨基酸鉴定[7]。

$$\text{DNS-Cl} + H_2N-CH(R)-COOH \longrightarrow \text{DNS}-SO_2NH-CH(R)-COOH$$

氨基酸与异硫氰酸苯酯(phenylisothiocyanate)能在温和碱性条件下发生酰化反应,再经强酸处理,即得很稳定的 PTH-氨基酸(3-phenyl-2-thiohydantoin-amino acid)。PTH-氨基酸可用各种层析法分离与鉴定,此方法称为 Edman 降解,它可从肽的 N 端逐一切下氨基酸,测定肽的顺序[7]。

$$C_6H_5NCS + H_2N-CH(R)-CO-NH-CH(R)-CO\cdots \xrightarrow{\text{碱性介质}} C_6H_5HN-C(=S)-NH-CH(R)-CO-NH-CH(R)-CO\cdots$$

$$\xrightarrow{H_3O^+} \text{PTH-氨基酸} + H_2N-CH(R')-CO\cdots$$

(二) CO_2 反应[8,9]

氨基酸中的氨基可和 CO_2 发生可逆反应,生成氨基甲酸盐

$$H_2N-\underset{R}{\overset{H}{C}}-COO^- \rightleftharpoons \left[{}^-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{H_2}{\underset{+}{N}}-\underset{R}{\overset{H}{C}}-COO^- \right] \rightleftharpoons {}^-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{H}{N}-\underset{R}{\overset{H}{C}}-COO^-$$

除了氨基酸的α-氨基,其他位置的氨基、多肽和蛋白质的末端氨基均有形成氨基甲酸盐的可能,但是环上的亚氨基不与 CO_2 反应。

(三) 席夫碱形成反应

羧羰基与伯胺反应得席夫碱(Schiff base),并由于 C ═N 键的关系存在着几何异构体。

$$RR'C=O + H_2N-R'' \rightleftharpoons RR'C(OH)(NH-R'') \rightleftharpoons RR'C=N-R''$$

席夫碱在碱催化下会发生互变异构。这新的异构体发生氨基移位时,如氨基连接在手性碳上可导致氨基酸消旋化。

$$RR'C=N-CH(R'')_2 \rightleftharpoons RR'C=N=C(R'')_2 \rightleftharpoons RR'CH-N=C(R'')_2$$

氨基酸与吡哆醛(pyridoxal)反应形成席夫碱,这是氨基酸在酶催化下发生转化的基础,其中包括转氨基、脱羧和消旋化等。反应需要有金属离子参与,如色氨酸与吡哆醛作用生成产物 **5**[10]。这类氨基酸(包括胺类)与醛的缩合反应是生物碱的生物合成的重要途径。

5

(四) 烷基化反应

烷基化是使氨基酸和肽类降低极性,便于鉴定和分离的重要方法,同时也是制备衍生物、增加分子多样性的重要手段之一。氨基酸中的氨基、羧基及侧链的巯基和羟基等都能发生烷基化。例如,碘乙酸与半胱氨酸的巯基反应,可用于研究蛋白

质中的半胱氨酰基。反应式如下

$$R—SH + ICH_2COOH \longrightarrow R—S—CH_2COOH + HI$$

氨基酸的氨基在弱碱条件下与2,4-二硝基氟苯(DNFB)反应,生成黄色的二硝基苯氨基酸(DNP-氨基酸)。蛋白质与2,4-二硝基氟苯反应,然后用20%盐酸水解,其中α-取代的DNP-氨基酸相当于蛋白质的N末端残基。其他的DNP-衍生物(如 ε-NH-DNP 赖氨酸, *O*-DNP 酪氨酸)则是链间氨基酸残基的衍生物。因此DNP衍生化反应可用于末端分析[7],反应式如下

$$O_2N-C_6H_3(NO_2)-F + H_2N-R \longrightarrow O_2N-C_6H_3(NO_2)-NHR + HF$$

氨基酸的氨基发生烷基化是制备 *N*-烷基氨基酸的方法,而 *N*-烷基氨基酸在一些植物、海洋生物来源的蛋白质及多肽抗生素中广泛存在,如 cyclosporin 就富含 *N*-甲基氨基酸。*N*-烷基氨基酸现也广泛用于多肽类药物的合成。

(五) 氨基与羧基共同参与的反应

氨基酸与光气反应生成 *N*-羧基酸酐(*N*-carboxy-anhydride, NCA, 也称 Leuchs 酸酐)。反应式如下

$$H_2N—CH(R)—COOH + Cl_2C{=}O \longrightarrow \text{NCA (R, H 取代的 噁唑烷-2,5-二酮)}$$

NCA具有相当的活泼性,因而能自身聚合成多肽,这也是早期合成聚肽的方法之一。但它生成的聚肽是无序的。近年来 Goodman 等[11]发展了用保护的 *N*-羧基酸酐 UNCA(主要为氨基甲酸酯保护基)作为原料合成肽的方法。此法具有操作简便、反应快速等优点,不仅能用于液相法,也能用于固相法。反应如下

$$H_2N—C(R_1)(R_2)—C(=O)—R + \text{UNCA}(R_3, R_4) \longrightarrow UN—C(R_3)(R_4)—C(=O)—NH—C(R_1)(R_2)—C(=O)—R \xrightarrow{\text{脱U}} \xrightarrow{\text{UNCA}} \text{多肽}$$

(六) 与金属离子的作用

氨基酸与金属离子如 Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 等,可以形成络合物。N上的孤对电子与金属络合后,氨基不再显示碱性,也就是说两性离子与金属离子络合而使溶液呈酸性。络合以后氨基酸在层析和电泳中的行为与游离态时差异很

大。有的氨基酸可利用其金属络合物的不同溶解度进行分离纯化,甚至可用于拆分消旋体,如用铜络盐方法拆分 *dl*-天冬氨酸[12]。

利用生成铜络盐,也可顺利进行α-烷基化,如利用铜络盐由甘氨酸制备苏氨酸即是一例[13]。

四、氨基酸的分离分析

(一) 颜色反应

天然产物中的氨基酸如果是以游离状态存在的,可直接用各种显色试剂显色鉴定;如果是结合状态,则需要水解后再用显色剂显色鉴定。用于氨基酸的显色剂很多,最重要和用途最广的是茚三酮(ninhydrin)。α-氨基酸与之生成紫蓝色衍生物(**6**)[14]。反应如下

$$H_2N-CH(R)-COOH + \text{ninhydrin} \longrightarrow \textbf{6}$$

非蛋白质氨基酸,由于结构变化很大,与茚三酮反应所产生的颜色差别也大。茚三酮还可与伯胺、仲胺、寡肽和氨基醇等显色反应。但叔胺与芳香胺与之不反应。

茚三酮的显色反应除了与氨基酸结构有关外,还与溶液 pH 及金属离子等有关。如果在显色剂中加入适量的金属离子(如 Ca^{2+}、Cu^{2+}),则可与不同氨基酸形成更有区别的颜色[15]。除了茚三酮之外,常用作氨基酸显色剂的还有吲哚醌(isatin),它与氨基酸反应的灵敏度不及茚三酮,显色也不稳定,但优点是对不同的氨基酸显示不同颜色,利于鉴别。

与氨基酸生成荧光产物的试剂有荧光胺(fluorescamine),它与氨基酸反应的荧光产物 **7**(Ex 390nm,Ex 475nm)很容易检测。

$$\text{fluorescamine} + H_2N-R \longrightarrow \textbf{7}$$

其他可用作氨基显色的试剂见表 10-2。

表 10-2　可用作氨基显色的试剂

反应名称	试剂	颜色	氨基酸
坂口反应 (Sakaguchi reaction)	α-萘酚和次氯酸钠	红	精氨酸及其他含胍基化合物
硝普盐反应 (nitroprusside reaction)	亚硝基铁氰化钠稀氨水溶液	红	半胱氨酸及其他巯基化合物
萨利文反应 (Sullivan reaction)	1,2-萘醌-4-磺酸钠和亚硫酸钠	红	半胱氨酸
波利反应 (Pauly reaction)	偶氮磺酸的碱性溶液	红	酪氨酸、组氨酸及其他异咪唑化合物
埃利希反应 (Ehrlich reaction)	二甲氨基苯甲醛的浓盐酸溶液	蓝	色氨酸及其他含吲哚环化合物
霍普金斯-柯尔反应 (Hopkins-Cole reaction)	乙醛酸和浓硫酸	红紫	色氨酸及其他含吲哚环化合物
福林-乔卡梯奥反应 (Folin-Ciocalteau reaction)	磷钼钨酸	蓝	酪氨酸
米隆反应 (Millon reaction)	浓硝酸的硝酸亚汞和硝酸汞溶液	红	酪氨酸及其他酚类化合物
黄色蛋白反应 (xanthoproteic reaction)	浓硝酸	黄	苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸
邻苯二醛反应 (phthalaldehyde)	邻苯二醛的乙醇溶液	黑绿色	甘氨酸

(二) 分离分析技术

可用于氨基酸的分离分析技术很多,早期常用的方法,如纸层析与纸电泳都曾被广泛应用过。现今最常用的方法为薄层层析,以硅胶、纤维素或聚酰胺为支撑体。

在各种薄层层析中,氨基酸可用各种显色剂检定,常用的有茚三酮,而对于含芳基的氨基酸(如 Phe、Tyr 和 Trp 等)也可用紫外吸收检测。

实现氨基酸定量分析的方法很多,自 1958 年 Moore 和 Stein 用离子交换层析(IEC)进行氨基酸定量分析以来,氨基酸的分析技术迅速发展,除了离子交换层析之外,利用气相层析(GLC)、高效液相层析(HPLC)及反相高效液相层析(RP-HPLC)等的氨基酸分析技术都取得了长足发展。但目前氨基酸分析仍以 IEC 为主。以茚三酮作柱后衍生检测的氨基酸分析仪得到不断改进,在速度和灵敏度上

都有很大提高,采取减小树脂粒度、增大柱压,将多级淋洗变为梯度淋洗,同时在仪器的自动化、电脑化上都有很大提高,从原来分析一个蛋白质水解液需要 1 天,进展到只需 0.5h,灵敏度能达到皮摩级[15]。

(三) 红外光谱[16]

氨基酸通常以两性离子形式存在,也可能以盐酸盐、金属盐形式存在。分子中既可以有游离的—NH_2、—COOH,也可以有解离的—NH_3^+、—COO^-。

当氨基酸呈游离状态或成盐酸盐时,其氨基都以—NH_3^+ 形式存在,在胺类正常的 NH 伸缩振动吸收范围内(3300~3500cm^{-1})不出现吸收峰,而在 3030~3130cm^{-1}之间出现一个峰(m),它是 NH_3^+ 不对称伸缩振动形式产生的吸收(脯氨酸例外,NH_3^+ 在 2900cm^{-1})。对称伸缩振动可能在 2000~3000cm^{-1}之间出现。氨基酸的金属盐一般在 3260~3390cm^{-1}有中等强度的—NH_2 吸收,而羧基成酯后则此吸收向低频移动。以上吸收峰一般都是宽峰。

—NH_3^+ 在 1485~1660cm^{-1}范围内可能出现一两个特征峰,在 1610~1660cm^{-1}(w)为不对称变角振动吸收,由于此峰常与—COO^- 吸收峰重叠,故常以—COO^- 主峰上的肩峰出现,第二个特征峰出现在 1485~1550cm^{-1},为对称变角振动吸收。

当—NH_2 上取代烷基后,—NH 的伸缩振动在3300~3500cm^{-1}处出现,如 *N*-甲基甘氨酸。

—NH_2 与—COOH 之间的碳原子数似乎并不影响氨基酸成为两性离子形式,如 $H_2N(CH_2)_{10}COOH$ 中依然存在—NH_3^+ 吸收峰。

游离氨基酸及其金属盐的—COO^- 在 1560~1600cm^{-1}有强吸收。当氨基酸成盐酸盐后,—COOH 具有正常的伸缩振动特征吸收,其峰的位置与—NH_2 的取代位置有关,α-NH_2 的 ν_{O} 在 1740~1750cm^{-1},其余的在 1700~1730cm^{-1}范围内。

为了从红外光谱进一步鉴别一天然产物是否为氨基酸,常将其制成盐酸盐和金属盐以进一步观察—NH、—COO^- 及 $\rangle$C═O 的吸收峰位置的改变。二羧基一氨基的氨基酸,IR 中除有—COO^- 和—NH_3^+ 吸收外,还显示了一个 $\rangle$C═O 吸收峰,二氨基一羧基氨基酸则还出现—NH_2 吸收峰。

(四) 质谱

氨基酸的质谱对决定多肽和蛋白质的结构至关重要,但由于游离氨基酸极性较强,因此在电子轰击条件下的分子离子峰很弱,甚至不出现[17]。一些能增加挥发性的衍生物都曾用于氨基酸的质谱研究[18],如乙酰化和三甲基硅烷化(**8**)等。

$H_3C—CH(CH_3)—C(H_2)—CH(NH_2)—COOC_2H_5$

$M^+ = 159$

$TMS—OCH_2CH_2CH_2—CH(NH—TMS)—COO—TMS$

8

$M^+ = 349$

利用质谱还可能决定氨基酸的绝对构型,用 Marfey 方法将氨基酸与 FDAA (1-氟,2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺)衍生化,用 LC-MS 可测定氨基酸的构型[19]。

由于质谱具有用量少的特点,加上近年来电离技术的改进,使它在多肽和蛋白质的结构测定中被广泛应用[20]。质子化氨基酸离子可通过化学电离(CI)、场解析(FD)、快原子轰击(FAB)等产生,特别是 20 世纪 80 年代末发展的电喷雾电离(ESI)和基质辅助的激光解析电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)极大地推进了多肽和蛋白质分子的结构分析。

(五) 琥珀酰胺氨酸的结构研究[21]

Agrobacterium fumefaciens 菌株可使烟草根瘤产生一种新的亚氨基酸——琥珀酰胺氨酸(succinamopine,**9**)。这一成分在酸性条件下极容易内酰胺化(lactamization)。**9** 在 pH 为 2 时室温放置几天就变成琥珀酰胺氨酸的内酰胺(**11**),如果提高温度则更进一步变成琥珀酸氨酸内酰胺(succinopine lactam,**12**)。因此这 3 个化合物的结构是同时被进行研究的。

9　X = NH_2　　**11**　X = NH_2

10　X = OH　　**12**　X = OH

9 对茚三酮反应呈阴性,它可用溴甲酚绿、硝酸银-甘露糖醇、硫氰酸铁等试剂测定。这些试剂对其内酰胺的灵敏度稍差。

9 和琥珀酸氨酸(succinopine,**10**)对次氯酸盐-联甲苯胺试验呈阳性,这说明结构中存在 >NH 。用电位滴定测得解离常数 $pK_{a_1} = 2.3$, $pK_{a_2} = 4.7$, $pK_{a_3} = 4.7$。这说明它存在两个羧基;在 pH 为 1.8 时电泳,向阳极移动很少,这也说明可能存在二羧酸亚胺结构。

化合物 **11** 的 NMR 有两组峰,其中一组为 δ2.98ppm(d)和 δ4.88ppm(t),积分比为 2∶1;另一组为 δ2.48ppm 和 δ4.55ppm(m),积分比为 4∶1。其中

δ4.88ppm 推测为氨基酸或 *N*-酰基氨基酸的α-H 信号，这是天冬氨酰的α-H，而 δ4.55ppm属于谷氨酰的α-H，由于受到另外 4 个质子的偶合而呈多重峰。**12** 经甲基化后，在 NMR 中出现 δ3.51ppm(s, 3H)和 δ3.58ppm(s, 6H)，即有 3 个甲氧基，说明 **11** 中存在 3 个可酯化的羧基。

化合物 **12** 的三甲酯，在 CCl_4 中测定其 NMR，提供如下结构信息：δ2.20ppm (2H, m, 谷氨酰β, γ-H)、δ2.80ppm(2H, d, *J* = 6 天冬酰β, β′-H)、δ3.54ppm (3H, s, —OCH_3)、δ3.60ppm(6H, s, OCH_3× 2)、δ4.30ppm(1H, m, 谷氨酰α-H)、δ4.85ppm(1H, t, *J* = 6, 天冬酰α-H)。在 IR 中，可见 1745 cm^{-1} (s, ν_{COOR})，1705 cm^{-1} (叔γ-内酰胺)、3000 cm^{-1} (NH 或 OH)。

用 FAB-MS 测定化合物 **9**，显示最强峰 *m/z* 为 245(M + H)，以及比较弱的 *m/z* 为 262(M + NH_4^+)和 *m/z* 为 489(2M + H)，并含有很弱的化合物 **12** 的相应峰。测得化合物 **9** 的分子离子峰 *m/z* 为 262，而化合物 **12** 的三乙酯的分子离子峰高分辨率 MS *m/z* 为 329.1464，完全符合其分子式 $C_{15}H_{23}NO_3$，从中可找到其主要的碎片峰，如失乙氧基峰(*m/z* 为 284)，失乙酯基(carbethoxyl, *m/z* 为 256)。

化合物 **11** 的绝对构型测定，参照天冬氨酰基和谷氨酰基的手性中心结构推测，天然的琥珀酸氨酸内酰胺(**12**)应该具有(*R*)-谷氨酰基和(*S*)-天冬氨酰基。化合物 **12** 的 CD 测定完全证明这一点，由于谷氨酰胺和它的 *N*-取代衍生物在 215nm 处有很强的 n→π* 跃迁，其椭圆率取决于手性中心邻位的羧基的解离程度，其绝对值羧基解离的要比不解离的大。如果化合物 **12** 的[ϕ]，pH 为 1 时为 -6.0，pH 为 5 时为 -29.3，pH 为 10 时为 -46.3。化合物 **12** 中的谷氨酰基手性中心为 *R*。

最后化合物 **9** 的结构用合成方法确证。将α-氧代谷氨酸(α-ketoglutamic acid)和(*S*)-天冬氨酸在 NaOH 和氰硼氢钠作用下缩合得琥珀酰胺氨酸的对映体和琥珀酸氨酸(succinopine，**10**)。此对映体在 pH 为 2.8 时可用电泳勉强分开。由于合成化合物 **9**、化合物 **11** 和化合物 **12** 所得的对映体其 pK_{a_1} 比 pK_{a_2} 有更大的区别，因此可利用甲酸调节的方法来分别合成。如果在 3.5mol/L 甲酸条件形成异琥珀酸氨酸内酰胺，在 4.8mol/L 甲酸时形成的则是琥珀酸氨酸内酰胺。

第二节　肽

肽和蛋白质都是重要的生命基础物质。多肽与蛋白质在基本结构上是没有区别的，只是分子大小的不同。现在习惯的区分是将相对分子质量 10 000 以下的(即约含 100 个氨基酸残基结构单元)称为肽，而大于此值则为蛋白质。另外，由于蛋白质的分子较大，因此分子内部各种能稳定结构的因素(如氢键、盐键等各种次级键及芳香基团间的相互作用等)明显大于多肽，因而蛋白质较之多肽具有更稳定

和复杂的高级结构。

肽和蛋白质在生命科学、生物医学及内分泌学中占有非常重要的地位。举凡细胞分化、免疫防御、肿瘤病变、抗御衰老与生殖控制等生理活动无不与多肽密切相关。许多天然和合成的多肽在生物医药中的应用是人们熟知的。例如,胰岛素用于治疗糖尿病,调钙素用于骨质疏松症,促黄体激素释放激素对于生殖系统疾病及一些多肽类抗菌素(如 Bleomycin)对于肿瘤具有抑制作用等,都说明了多肽类药物的重要性。

作为各种酶的重要组分的蛋白质,对于生命活动的重要性更是不言而喻的。没有这些重要生物催化剂的作用,生命活动就将停止。因此研究多肽和蛋白质化学对于了解生命现象和改善生命活动是非常重要的[22]。

一、肽和蛋白质的结构和特性

肽和蛋白质都是由氨基酸通过酰胺键(—CONH—)联结而成。例如,一个由丙氨酸(alanine)、半胱胺酸(cysteine)和缬氨酸(valine)组成的三肽结构如下

$\overset{+}{N}H_3$ H N O N H O⁻ O O SH

在三肽中含有两个酰胺键。由于羰基与氮原子之间的键已具有部分双键性质,限制自由旋转。因此,这 4 个原子处于同一平面,这一结构特征对于肽和蛋白质的空间构象是非常重要的。

H_2 C N H ⟶ O^- C $\overset{+}{N}$ H

按其结构特征,肽又可分为直链肽,即

$$H_3\overset{+}{N}\underset{\underset{R}{|}}{C}HC(=O)(NH\underset{\underset{R}{|}}{C}HC(=O))_nNH\underset{\underset{R}{|}}{C}HCOO^-$$

例如,促黄体激素释放激素(LHRH)即为链状十肽。除了直链肽之外,环肽也广泛存在于自然界,如以硫-硫键相连的催产素(oxytoxin),结构式如下

Glp–His–Trp–Ser–Tyr–Gly–Leu–Arg–Pro–Gly–NH₂

Cys–Tyr–Ile–Gln–Asn–Cys–Pro–Leu–Gly–NH₂
(第1位 Cys 与第6位 Cys 以 S—S 相连)

另一类环肽是头尾以酰胺键相连的,如众多的环肽类抗菌素即是,它们中有些

含有非天然氨基酸,如 Cyclosporine A,结构式如下

近年来,从植物中发现的环肽也不断增加,其中一类叫环肽;另一类叫大环寡肽(cyclotide)。前者肽键长度通常小于 14 个氨基酸残基,无二硫键形成,而且大都含有修饰的氨基酸,属于植物次生代谢产物[23];大环寡肽多由 28~ 37 个氨基酸残基组成,分子内存在二硫键,其序列由 DNA 解码,具有精细的三维结构,为基因产物[24]。如由 29 个氨基酸组成的 kalata B1[25]。植物大环寡肽主要分布于堇菜科、茜草科和葫芦科中,具有多方面的生物活性[26,27]。

除了上述常见的环肽之外,还有内酯肽及侧链环肽等。

二、天然的生物活性多肽

迄今为止,对生物活性多肽的研究主要集中在动物、特别是哺乳动物来源的生物活性肽。它们在哺乳动物如人类的所有内分泌脏器中都有分布。

从哺乳类动物得到的多肽类激素种类多,分布广,生理功能显著。但这类多肽的含量都非常少。例如,促黄体激素释放激素(LH-RH)存在于下丘脑中,20 世纪 70 年代初,Schally 与 Guillemin 等从数十万头猪或羊的下丘脑中才分离纯化得到毫克量的提抽物,并借此确定了 LH-RH 的结构[28]。

表 10-3 所示的多肽激素根据它们来源不同的内分泌腺及作用靶细胞的不同,大体可分为下丘脑、垂体、胃肠、胰腺及组织激肽等[29]。但是多肽激素研究的进展表明,它们的分布是很广泛的。例如,从两栖类动物蛙皮分离得到的蛙皮肽类,表明它们与从高等动物组织中分离得到的活性肽有相同的生理功能与很高的结构同源性。因此,Erspamer[30] 在比较和总结生物活性肽的分布情况后,提出了三角分布(脑、肠、皮)的观点。近来还有一种观点,认为应将神经肽与其他活性肽

区别开来,即将由神经细胞合成并释放、作用于神经元的多肽称之为神经肽[31]。正如上述“三角”分布所阐述的情况,多肽在动物体内的分布是很难界定在某一特定组织内的。有些生物活性肽如激肽类,不但存在于高等动物中,也遍存于低等动物中。蜂毒素是一个26肽,可明显抑制肝癌细胞生长。文蛤多肽是一个33肽,也有抗肿瘤活性。

表 10-3　主要的多肽激素的分布及生理效应

内分泌腺	多肽激素	主要靶器官	生物效应
腺垂体	促黄体生成激素(LH)或促间隙细胞激素(ICSH)	卵巢、睾丸	促性腺发育,性激素的生成和分泌,排卵
	促卵泡成熟激素(FSH)	卵巢、睾丸	促卵泡发育,精子的生成,协调 LH 的作用,性激素的合成和分泌
	促甲状腺激素(TSH)	甲状腺	促甲状腺生长,甲状腺素的形成和分泌
	催乳激素(PRL)	乳腺,黄体	乳腺增殖和泌乳的启动,刺激黄体
	生长激素(GH)	全身	骨骼、肌肉生长和代谢
	促肾上腺皮质激素(ACTH)	肾上腺皮质	促肾上腺皮质生长,肾上腺皮质激素的生成和分泌
	脂肪酸释放激素(β-LPH)	—	激素原,β-内啡肽与β-促黑激素等的前体等
神经垂体	催产素	子宫平滑肌,乳腺平滑肌	分娩时子宫收缩,产后排乳
	加压素	小动脉,肾小管	水的重吸收,血压升高
胰腺	胰岛素	肝、脂肪组织、肌肉	糖的利用,降低血糖,生脂作用
	胰高血糖素	肝、脂肪组织、肌肉	糖元分解,脂类释放,升高血糖
	胰脏多肽	—	—
消化道	胃泌素	胃	胃酸分泌
	胆囊收缩素(CCK)	胆囊、胰腺	胆囊收缩,排胆汁,胰酶分泌
	促血管舒张肠肽(VIP)	血管平滑肌等	与胰高血糖素、肠促胰泌素的效应相仿
	抑胃肽(GIP)	胃、胰腺	抑制胃酸分泌,刺激胰岛素分泌
甲状旁腺	甲状旁腺激素(PTH)	骨骼、肾、肠道	升高血钙,调节磷代谢
	降血钙素(CT)	骨骼等	降低血钙,调节磷代谢
黄体	松弛素	耻骨联合、子宫肌	产道肌肉松弛等
胸腺	胸腺激素等	淋巴系统	刺激 T-细胞成熟分化,增强机体免疫能力

迄今为止,已阐明结构的植物来源的活性肽还较少,但微生物和真菌中都富含肽类物质,如多肽抗菌素。青霉素和头孢霉素家族,这两类重要的抗菌素即为含环

内酰胺结构的三肽。

抗菌多肽(valinomycin)[32]具离子通道功能,有抗细菌和真菌活性。Nisin 具有更复杂的环状结构,它现被用作食品防腐剂。自 1971 年结构被确定以来,Shiba 等[33]对其进行了构象研究并已化学合成。特别值得一提的是环胞肽(cyclosporin),它是从霉菌 *Trichoderma polysporum* 以及 *Tolypocladium inflatum* 中分离得到的,是富含 D-氨基酸及非天然氨基酸的环肽。它不仅能抑制真菌和酵母的生长,同时也具有抗炎症活性,是重要的免疫抑制剂,被用于器官移植手术中[34]。从昆虫中已经获得 100 多种抗菌肽,其中家蚕的抗菌肽 D 和蛇毒 13 肽,对 G^+ 和 G^- 菌均有很强杀菌作用。从毒蜘蛛获得的 33 肽有很强镇痛作用[35]。

(一) 肽的分离纯化实例

一般地讲,用于氨基酸、肽与蛋白质的纯化方法大致相同,如层析、电泳及离子交换等。近代在肽类化合物的分离方法中,最具实用价值的方法有如下几种。

1. 凝胶过滤

凝胶过滤又称分子筛,实际上它又可视为体积排阻层析,用作支撑物的是一类多孔的高分子。在这类柱分离中,肽类混合物中的小分子可以进入多孔的支撑物,而大分子则不能进入。因此,大分子先洗脱下来,而小分子则随后流出,达到分离目的。

2. SDS-page 电泳

聚丙烯酰胺(polyacrylamide)也是一种凝胶,它更多地被用作电泳支撑物。SDS-page 电泳广泛地用于肽与蛋白质的分析鉴定。

3. 高效液相层析

反向高效液相层析(RP-HPLC),是目前被广泛用于多肽类化合物的分离技术。在此,它的固定相为非极性的烷基化硅胶,而移动相为极性洗脱液,通常为各种 pH 与离子浓度的缓冲液,为了改进洗脱效果,通常加入一些有机溶剂作改进剂,常用的溶剂有乙腈、甲醇等,其中尤以乙腈为佳,因为它黏度低并且具有良好的溶解性能。这样极性大的肽先洗脱下来,而极性小的则随后。RP-HPLC 是分离多肽混合物的有效手段。如果选择好适当条件,则可将性质非常类似、结构差别很小的肽类混合物分开,实例见图 10-1。

其他一些常用于多肽类化合物分离的技术,如等电聚焦(isoelectric focusing)、毛细管电泳(capillary electrophoresis)及 SDS-page 电泳等同样也广泛地应用于蛋白质的分离鉴定,较详细的叙述见蛋白质部分。

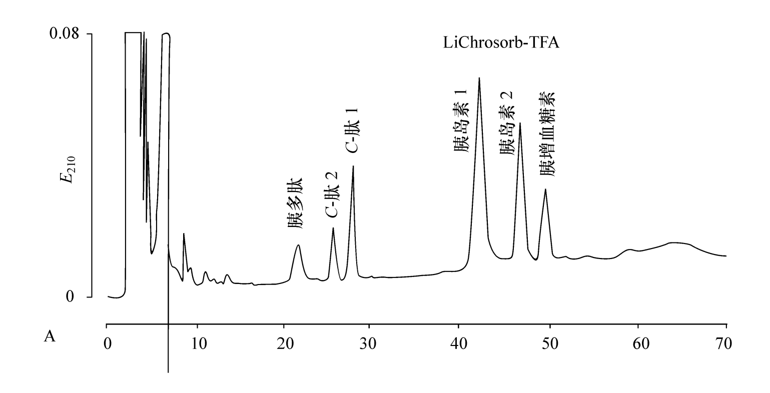


图 10-1 反相高效液相层析分离合成的不同种族 GnRH[36]

每种 GnRH 上样 0.2μg。VydacC$_{18}$(5μm),0.21cm× 15cm 柱,

TEAP 缓冲液 pH 为 6.5,流速 0.2mL/min

4. 生物活性多肽的分离、纯化及结构测定实例

生物活性肽在动物组织中存在含量极微,它的提取和纯化过程也是很复杂的。一个纯的活性肽的获得通常都需要通过大量艰苦工作。

促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone,GnRH)或促黄体激素释放激素(leuteinizing hormone releasing hormone,LH-RH)的提取、分离及纯化鉴定就是一个非常复杂的过程。GnRH 主要存在于哺乳动物的下丘脑,为一直链十肽,它的主要功能是促进黄体生成激素(LH)的释放及卵泡成熟激素(FSH)的分泌。McCann 等虽早就报道了下丘脑的粗提物有促排卵作用,但真正获得纯的产品并确定其结构是由 Schally 等及 Guillemin 等完成的。

1971 年,Schally 等报道了这一艰巨工作[37],由 165 000 头猪下丘脑(重 2500g)经 12 步分离提纯,最后得到 1mg 多的纯品,具较强的刺激释放 LH 和 FSH 活性。其分离步骤简述如下:

165 000 头猪下丘脑(2.5kg) $\xrightarrow[\text{2mol/L HOAc}]{\text{粉碎,去脂}}$ 抽提液冷冻后 $\xrightarrow{\text{冰醋酸}}$ 冷冻干燥粉(665g) $\xrightarrow[\text{Sephadex G25, 1mol/L HOAc}]{\text{凝胶过滤}}$

具 LH 和 FSH 活性部位的冻干粉(380g) $\xrightarrow{\text{去盐,用苯酚抽提}}$ 83g(LH 释放活性 30~150μg,FSH 100μg)

$\xrightarrow{\text{CMC, NH}_4\text{OAc}}$ 277mg(LH 0.1μg,FSH 0.4μg) $\xrightarrow{\text{电泳(FFE)}}$ 94.8mg(LH 50ng,FSH 0.3μg) $\xrightarrow{\text{逆流分溶}}$ 14.2mg(LH 2~25ng,FSH 10~30ng) $\xrightarrow[\text{Sephadex G25}]{\text{分配层析}}$ 2.3mg $\xrightarrow{\text{区带电泳}}$

830μg

以上所述为自动物组织中分离提取生物活性肽的典型步骤。当然,近年来由于分离技术的进步,特别是高效液相色谱的广泛应用,分离提纯步骤可以大大简化并提高效率。

(二) 肽的合成

从 19 世纪 80 年代 E. Fischer 与 T. Curtius 第一次成功地合成多肽开始,迄今已有 100 多年历史。近年来,有机合成化学与近代分析技术的进步,使得多肽合成化学更趋成熟。特别是固相合成技术的发展,及随之而实现的机械化、自动化,使得快速、方便地合成多肽成为现实。大多数肽类化合物在自然界存在很少,而且还存在一些结构上的不稳定性,而化学合成的多肽或修饰的多肽类化合物可以克服这些缺点,可以提供种类繁多的多肽类药物,在生命科学的发展中起了重要作用。

简单地讲,两个氨基酸就可组成肽(二肽),但实际上并不能由两个氨基酸直接缩合成二肽,这在热力学上是不利的。

$$^{+}NH_3CHR'COO^{-} + {}^{+}NH_3CHR''COO^{-} \not\longrightarrow {}^{+}NH_3CHR'CONHCHR''COO^{-} + H_2O$$

要实现一个简单二肽的合成通常步骤是:将作为羧基组分的氨基酸的氨基加以保护,同时将作为氨基组分的氨基酸的羧基加以保护。

$$^{+}NH_3CHR'COO^{-} \longrightarrow \underset{\text{羧基组分}}{XNHCHR'COOH}$$

$$^{+}NH_3CHR''COO^{-} \longrightarrow \underset{\text{氨基组分}}{NH_2CHR''COOY}$$

$$XNHCHR'COOH + NH_2CHR''COOY \longrightarrow XNHCHR'CONHCHR''COOY$$

活化羧基组分中羧基的方法很多,可通过形成酰卤、酸酐或各种类型的活化酯或其他活性衍生物以实现羧基的活化。

(1) 氨基的保护

在种类繁多的氨基保护基中,最常用的还是氨基甲酸酯(urethane 或 carbamate)。其中最常用的与最具代表性的有苄氧羰酰基(benzyloxycarbonyl, Z)[38]、叔丁氧羰酰基(*t*-butyloxycarbonyl, Boc)[39] 及芴甲氧羰酰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc)[40]。

作为早期广泛被应用的 Z,它的优点是氨基酸衍生物易于制备与结晶。它可用酸解(HBr-AcOH) 或氢解脱除。随后发展的 Boc 更具实用性,特别是在固相肽合成中,Boc 对酸敏感,可在酸性条件下去除,常用的试剂有 CF_3COOH,或 HCl-有机溶剂。反应式如下

$$C_6H_5CH_2OC(=O)-NH-R + HBr \longrightarrow H_2N-R + C_6H_5CH_2Br + CO_2$$

$$C_6H_5CH_2OC(=O)-NH-R + [H]/Pd \longrightarrow H_2N-R + C_6H_5CH_3 + CO_2$$

$$[(CH_3)_3COCO]_2O + NH_2CHRCOOH \xrightarrow{H^+} (CH_3)_3COCONHCHRCOOH$$

$$(CH_3)_3COCONHCHRCOOH \xrightarrow{H^+} \overset{+}{N}H_3CHRCOOH + (CH_3)_2C=CH_2 + CO_2$$

Fmos 是对碱敏感,对酸稳定的氨基保护基。碱性试剂如有机碱吗啉(morpholine)、六氢吡啶和二乙基胺都能使其脱除。反应如下

$$\text{(芴基)}CH_2OCOSu + NH_2CHRCOOH \longrightarrow \text{(芴基)}CH_2OCONHCHRCOOH$$

$$\xrightarrow{\text{六氢吡啶}} NH_2CHRCOOH + \text{(芴=}CH_2\text{)} + CO_2$$

(2) 羧基的保护

相对于氨基保护而言,羧基的保护基种类要简单得多。在最简单的情况下,通过与碱金属成盐就可保护。但通常都是酯化成甲酯、乙酯、叔丁酯或苄酯等保护。甲酯或乙酯可通过皂化脱除,苄酯用催化氢解脱除。叔丁酯的脱除则通常用酸解(HCl、CF_3COOH 等)实现。

(3) 侧链基团的保护

在天然氨基酸中,有些还带有功能侧链,如半胱氨酸的巯基、丝氨酸与酪氨酸的羟基、精氨酸的胍基和组氨酸的咪唑基等。这些官能团一般都需要加以保护,而这些保护基团的选择应与α-氨基与羧基的保护基团协调配合。

(4) 肽键的形成

正如前述,几乎所有肽键形成的方法都是活化羧基组分中的羧基,以利于氨基的亲核进攻。早期应用的方法如酰氯(RCOCl)、叠氮($RCON_3$)由于存在一些缺点,现已较少应用。现在形成肽键的常用方法有活化酯法、酸酐法及缩合剂。

氨基酸的羧基与带有吸电子基团的烷基或芳烃衍生物形成的酯具有足够活性,利于氨基的亲核进攻而形成肽键,这即是活化酯法。常用的酯基有对硝基酚[41]、*N*-羟基琥珀酰亚胺[42]、五氟苯酚等[43]。反应如下

$$XNHCHR'COOR + NH_2CHR''COOY \longrightarrow XNHCHR'CONHCHR''COOY + ROH$$

$$R = -C_6H_4-NO_2,\ -N(COCH_2CH_2CO),\ -C_6F_5\ 等$$

通过形成酸酐活化羧基实现肽键形成的方法,也是被广泛应用的。特别是保护氨基酸与氯代甲酸酯生成的混合酸酐更被广泛应用。此法的优点为产物干净,副反应少。

相较上述方法而言,使用缩合剂的方法似更便捷。最常用的缩合剂有二环己基碳二亚胺[44]。由于它的使用方便,被广泛地用于液相与固相合成中。反应如下

$$XNHCHR'COOH + NH_2CHR''COOY + C_6H_{11}-N{=}C{=}N-C_6H_{11} \longrightarrow$$

$$XNHCHR'CONHCHR''COOY + C_6H_{11}-NH-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-C_6H_{11}$$

近 20 多年来,各种结构类型的缩合剂相继出现。其中以 Castro 首先使用的 BOP 试剂最具实用性[45]。这些缩合剂结构各异,有磷正离子、碳正离子和氮正离子等类型[46,47],它们一般都具有缩合能力强和副反应少等优点。例如,一类含吡啶盐结构的缩合剂(BEP、FEP 等)更适合于空间位阻大的肽的合成[47]。

(5) 肽的固相合成

上述的肽键形成方法对于液相或固相肽合成都是相同的。但在实现的方式或手段上却是不同的。固相合成是以一种不溶的高分子为载体,实现在半杂相情况下的缩合,用过量的反应物与缩合剂以使缩合反应接近完全,过量缩合剂与反应物则用简单的洗涤方法除去。连接在不溶的高分子物上的肽再经过重复的操作方式增长。以合成一个含 A、B、C、D、E、F 的六肽为例,其合成流程如图 10-2 所示。

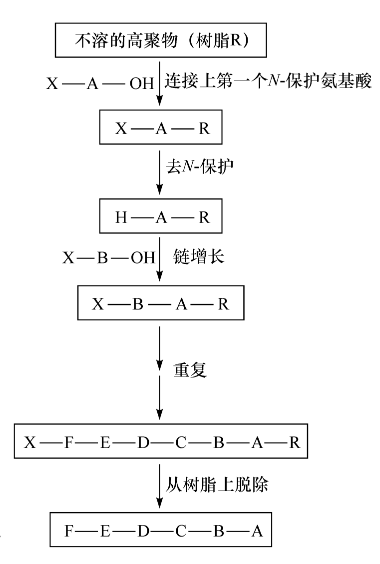


图 10-2　六肽合成流程示例

固相肽合成实现了肽合成的新概念,具有方便、简单的特点。自 1963 年 Merrifield[48] 首次发展这个方法之后,经过不断改进与完善已经实现自动化,作为载体的树脂

也不断改进,现在在多肽合成及多肽类药物合成中都广泛采用固相法。

参 考 文 献

[1] Kreil G. Arnn Rev Biochem,1997,66:337

[2] Kuroda Y et al. J Antibiotics,1980,33:259

[3] Rosenthal G A. Plant Nonprotein Amino and Imino Acids. New York:Academic Press,1982

[4] Parameswaran P S et al. J Nat Prod,1997,60:802

[5] Taddei A et al. J Antibiotics,1997,50:256

[6] Gray N R. Methods in Enzymology. New York: Academic Press,1972,25

[7] 夏其昌等. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京:科学出版社,1997,80

[8] Caplow M. J Am Chem Soc,1968,90:6795

[9] Morrow J S et al. J Biol Chem,1974,249:7484

[10] Schott H F et al. J Biol Chem,1952,196:449

[11] Goodman M et al. Biopolymers,1996,40:183

[12] Harada et al. Bull Chem Soc Japan,1983,56:653

[13] Barretl G C. Chemistry and Biochemistry of the Animo Acids. New York: Chapman and Hall,1985,365

[14] Dawson R M et al. Data for Biochemical Research. Oxford:Oxford University Press,1969

[15] 常碧影等. 分析化学,1993,21:1220

[16] Bellamy L J. The Infrared Specfra of Complex Molecules. New York:John Wiley,1975

[17] 刘淑莹等. 物理化学学报,1997,13:252

[18] Biemeun K et al. J Am Chem Soc,1961,83:3795

[19] Ken-ichi Harada et al. Tertrahedron Lett,1995,36:1515

[20] 夏其昌等. 蛋白质化学研究技术与进展,北京:科学出版社,1997,165

[21] Chilton W S et al. Biochemistry,1984,23:3290

[22] 汪猷. 天花粉蛋白(第二版).北京:科学出版社,2000

[23] Mu Q et al. J Pharmazie,2003,58:10

[24] Witherup K M et al. J Nat Prod, 1994,57:1619

[25] Saether O et al. Biochemistry,1995,34:4147

[26] 窦辉等. 天然产物研究与开发,2004,16:76

[27] Claeson P et al. J Nat Prod,1998,61:77

[28] 叶蕴华等. 北京大学学报(自然科学版),1996,26:207

[29] 龚岳亭. 生物活性肽. 北京:科学出版社 1985,40

[30] Erspamer V. Trends in Neurosci,1983,6:200

[31] 杜雨苍. 神经肽与脑功能. 上海:上海科技教育出版社,1998,7

[32] Brockma H et al. ChemBer,1955,88:57

[33] Shiba T et al. Peptide Chemistry,1988,337

[34] Theodos W, Miklos B. The World of Peptides. Berlin Heidelberg:Springer Verlag,1991,

211
[35] 吴梧桐等. 中国天然药物, 2004,2:70
[36] Milles C, Rivies J. Biopolymers,1996,40:265
[37] Schally A V et al. Biochem Biophycs Research Communications,1971,43:393
[38] Bergmann M L. Zervas Ber,1932,65:1192
[39] Carpino L A. J Am Chem Soc,1957,79:98
[40] Carpino L A et al. J Am Chem Soc,1970,92:5748
[41] Bodanszky M. Nature,1955,175:685
[42] Anderson G W et al. J Am Chem Soc,1963,85:3039
[43] Kovacs J et al. J Am Chem Soc,1967,89:183
[44] Sheehan J C et al. J Am Chem Soc,1955,77:1067
[45] Castro B. Tetrahedron Lett,1975:1219
[46] Li P et al. J Peptide Research,2001,58:129
[47] Li P et al. Tetrahedron,2000,56:8119
[48] Merrifield R B. J Am Chem Soc,1964,86:30

第十一章　碳水化合物

第一节　概　　述

碳水化合物(carbohydrate)广泛存在于自然界,是各种生物的重要组成成分。从量上来讲,碳水化合物是地球上最大量的一类有机物。据估计,地球上的绿色植物每年净产有机物$(15\sim 20)\times 10^{10}$ t,其中纤维素约占 1/2;存在于节肢动物的甲壳和真菌细胞壁中的几丁质每年也约有1×10^{10} t 生成。人们熟知的重要的碳水化合物还有:①植物光合作用产生的葡萄糖,是动植物主要的能量物质和碳源;②大米和小麦等食用植物中的淀粉,是人类主要的食物;③甘蔗和甜菜中的蔗糖,是人类主要的甜味剂;④脱氧核糖和核糖,是一切生物的遗传物质 DNA 和 RNA 的重要成分;等等。然而,碳水化合物的存在和作用远非这些常识所能包括,现代分离分析技术、化学和生物学的迅猛发展已揭示出了一个全新的、五彩缤纷的碳水化合物世界。

首先,碳水化合物无所不在,并且不仅仅以单糖(如葡萄糖)、寡糖(如蔗糖)和多糖(如淀粉、纤维素和几丁质)的形式存在,更多是与其他非糖分子共价相连(称为糖苷或糖缀合物)。例如,植物的各种次生代谢产物(狭义的天然产物)大都有糖苷化的存在形式;动物中蛋白质的糖基化也是非常普遍的现象。其次,碳水化合物结构的复杂性和多样性是惊人的。还有,碳水化合物的功能绝非仅仅在于能量存储和结构支撑上,一般来说,糖缀合物中的碳水化合物影响了非糖部分的生理过程和功能,并且在很多时候起到分子识别的作用。这种糖的识别作用涉及生命的几乎全部的时间和空间过程,如受精、着床、分化、发育、免疫、感染、癌变、衰老等。近 20 年来逐渐形成的糖生物学(glycobiology)作为一门新学科正是研究上述内容的[1,2]。

对于碳水化合物的研究起始于 19 世纪末,E.Fischer 利用化学转化、旋光和熔点相关等原始的化学研究手段阐明了六碳糖的结构,这一工作奠定了糖化学的基础[3]。20 世纪 30 年代,Haworth 和 Hudson 等提出了单糖的三维结构模型并引入“构象”(conformation)这一重要概念[4]。这些研究也是有机化学发展历史上的关键性事件。由于糖的水溶性、难结晶和立体化学的复杂性等原因,随后的研究进展十分缓慢,大量工作花在分离、纯化和结构测定上。Leloir 在 1950 年发现寡糖在生物体内是由糖基转移酶以糖基焦磷酸核苷为给体催化合成的,这可能是迄今糖生物学研究中最重要的事件[5,6]。Fischer、Haworth 和 Leloir 由于对碳水化合

物的研究而先后获得诺贝尔奖。

在碳水化合物的研究历史上,又一个重大的事件是在 1975 年前后发现糖缀合物的微观不均一性(microheterogeneity)[1,2]。例如,对一个糖蛋白来讲,其肽链的氨基酸顺序是一定的,其中的糖基化位点也是一定的,但糖链的结构却不是一定的,而是一个具有一定特点的结构分布。糖脂、蛋白聚糖和植物糖苷等其他糖缀合物也有类似现象。这是由糖链的生物合成途径造成的。一般来说,一个糖基转移酶或糖苷水解酶决定一个糖苷键的生成或断裂,这与核酸和蛋白质的模板合成途径是有本质不同的。糖的微观不均一性给糖的分离、结构分析、生物工程制备等带来了极大的困难。

近年来,碳水化合物的分离主要依靠各种高效液相色谱;结构分析主要由核磁共振和质谱来完成。同时,各种生物学技术为碳水化合物结构和功能的研究提供了越来越多的手段,如糖基转移酶和水解酶的应用、抗体技术、基因转染和基因剔除等。由于碳水化合物的微观不均一性,在天然来源困难和有限的情况下,化学合成是提供各类结构碳水化合物的重要手段。在 20 世纪 80 年代以前,一个二糖的合成已是一个了不起的成就[7],现在任何复杂的寡糖都可以被合成,但相比核酸和多肽的自动化合成,寡糖的合成还很低效。

总之,碳水化合物的研究已到了一个新的历史时期,研究手段和对结构与功能的认识期待新的突破。正如 2001 年 3 月 *Science* 关于碳水化合物专栏的标题写的那样:灰姑娘的马车已准备就绪[8]。

第二节　碳水化合物的结构

碳水化合物原意是指分子式可用 $C_x(H_2O)_y$ 来表示的一大类物质,如葡萄糖的分子式为 $C_6(H_2O)_6$、蔗糖的分子式为 $C_{12}(H_2O)_{11}$ 等。后来发现有些化合物从化学结构和性质上看和碳水化合物相似,但不符合这一通式,如 6-位脱氧的鼠李糖,它的分子式为 $C_6H_{12}O_5$,而另有些化合物,如乳酸和丙烯酸等的分子式符合这一通式,但却不是碳水化合物。因此,碳水化合物这个名词按字面意义已不确切。糖(sugar)是这类化合物的另一常用的名称。

碳水化合物或糖是指天然存在的单糖、寡糖、多糖和它们的衍生物。寡糖和多糖是由两个以上的单糖脱水而成的,一般以十聚为界,但两者之间没有严格的界限,如果有精确的结构,即使相对分子质量高些仍可称为寡糖。在更多的时候,碳水化合物是与各类非糖分子的羟基、巯基、氨基和次甲基等以共价键相连的形式存在,当非糖部分较小时,称糖苷化合物(glycoside);当非糖部分较大时,称为糖缀合物(glycoconjugate),但二者之间也没有明确的定义。

单糖,主要是五碳糖(戊糖)和六碳糖(己糖),是碳水化合物的基本单元。因

此,了解单糖的结构是碳水化合物研究的基础。

一、单糖的化学结构和构型

单糖是指具有碳链骨架的多羟基醛或酮,前者称为醛糖(aldose),后者称为酮糖(ketose)。最简单的醛糖是甘油醛,最简单的酮糖是二羟基丙酮。甘油醛含有一个不对称中心,因此有两个立体异构体(对映异构体),随着单糖分子中不对称碳数目(n)的增加,其立体异构体的数目也成几何级数(2^n)递增。图 11－1 列出了 α-D-四碳到六碳糖的呋喃和吡喃型结构的 Haworth 透视式。

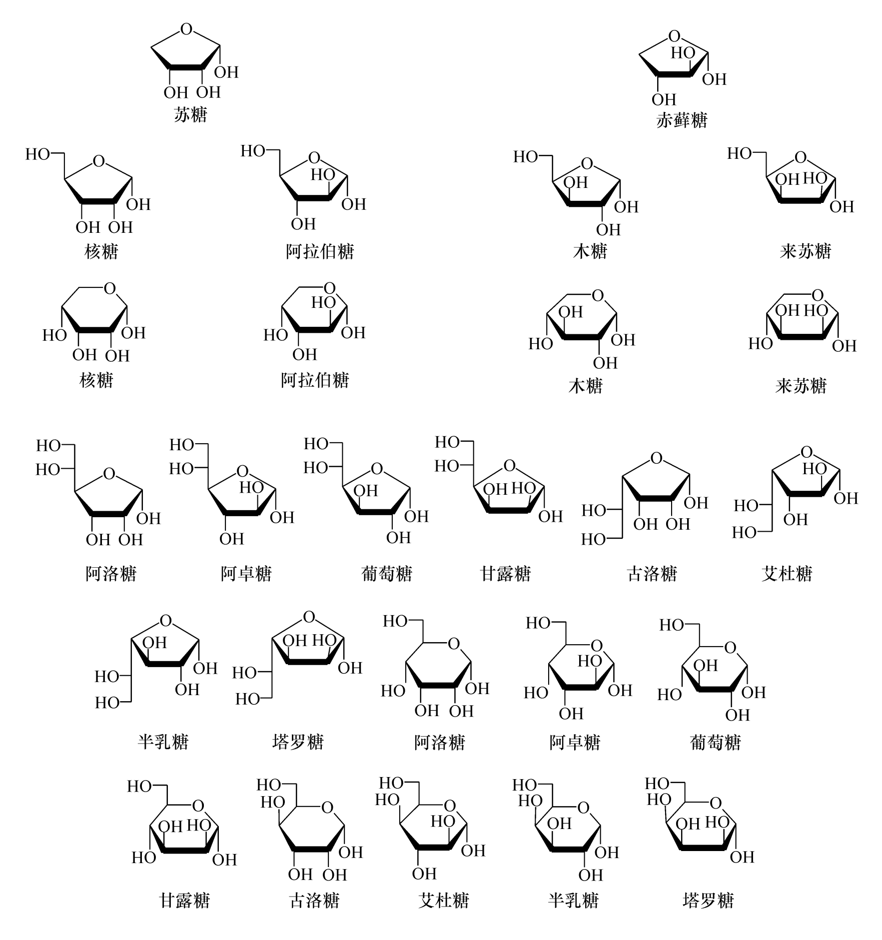


图 11－1 α-D-四碳至六碳呋喃和吡喃醛糖的 Haworth 透视式

以上所有的单糖都通过形成分子内半缩醛而形成稳定的五元(呋喃型)或六元环(吡喃型)结构。在晶体状态,所有的单糖正是以环状的半缩醛结构存在;只有在溶液中,才存在微量的开链的单糖。

由于在形成半缩醛时,分子中又增加了一个不对称碳原子,因此其异构体的数目又增加了1倍,这一不对称碳被称为异头碳(anomeric C-atom)。在Haworth投影式中,以所形成的五元环或六元环平面为参照,D型糖的异头位羟基如果处在环的下方则称为α-型;在环的上方称为β-型。对于L型糖则相反。以溶液中的葡萄糖为例,可发生图11-2所示的互变异构。

图11-2　D-葡萄糖在水溶液中的主要互变异构体

对于六元环吡喃糖的立体构型,有一个特殊而重要的现象就是所谓的"异头碳效应"(anomeric effect)[9,10]。即对D-吡喃糖来说,异头位吸电子的取代基处于直立的α-构型比相应的处于平伏的β-构型在能量上有利(约低3.0kJ/mol)。这一效应与六元环上直立键立体不利的通常现象相反。对这一效应有两种解释:①偶极效应。如图11-3所示,当吸电子取代基X处于α-键时,相邻的两个偶极部分抵消,因而能量有利,而X处于β-键时不能抵消。②电子共振效应。当取代基X处于α-键时,异头碳与X成键的δ^*轨道共享环上氧原子的孤对电子($n\rightarrow\delta^*$),而X处于β-键时不能共享。在讨论糖苷键的形成和断裂时,常常需要考虑异头碳效应。

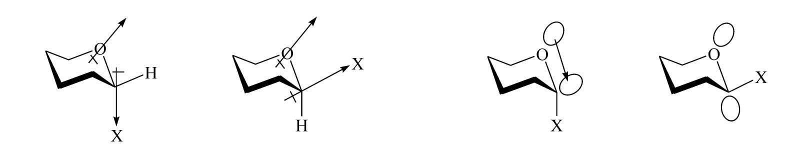
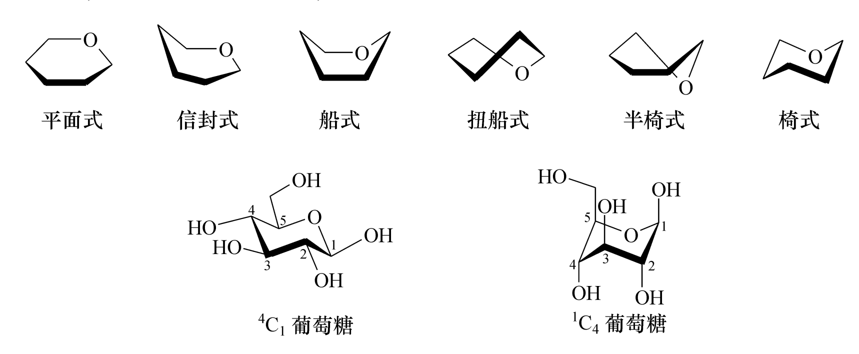


图 11－3　吡喃糖的异头碳效应

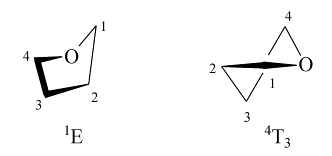
二、糖的构象

吡喃糖环在理论上有无数多的不同构象，较直观的有以下六种，即平面式(plane)、信封式(envelope)、船式(boat)、扭船式(skew)、半椅式(halfchair)和椅式(chair)。在平面式中，所有环上碳原子的取代基处于 Newman 投影式的重叠位置而能量最高，因此实际上平面式是检测不到的，而处于椅式构象时，所有环上碳原子的取代基处于 Newman 投影式的交叉位置而能量最低。因此，这是吡喃糖通常存在的构象。其他构象的能量处于两者之间。对于椅式构象，又有两种可能的排列方式：当观察以 C–2、C–3、C–5 和 O 所构成的平面，其数字大小按顺时针方向取向时，其中的 C–1 在环平面的下方、C–4 在环平面的上方时，这种构象称为 $^{4}C_{1}$；C–1 在环平面的上方、C–4 在环平面的下方称为 $^{1}C_{4}$。对 β–D–葡萄糖来说，分子处于 $^{4}C_{1}$ 构象时，所有的羟基都位于平伏键，此时的能量最低，而当分子处于 $^{1}C_{4}$ 构象时，所有的羟基都位于直立键，显然能量上不利。两种构象之间的相互转换要克服一定的能垒，如果这一能垒相当小，就有可能同时存在两种构象。



呋喃糖环在理论上也有无数多的构象，其中能量较低的构象有两种，即信封式(envelope)和扭曲式(twist)。在信封式构象中，包括氧原子在内有 4 个环原子几乎是共平面的，另一个环原子在平面之外，如 ^{1}E 表示其构象为信封式，C–1 位于 C–2、C–3、C–4 和 O 所构成的平面的上方。扭曲构象中 3 个相邻环原子共平面，其余两个环原子在该平面的上下方，如 $^{4}T_{3}$ 代表扭曲式的构象，其中 C–4 在 C–1、C–2

和 O 所组成平面的上方,C-3 在平面的下方,判断平面上下的规则与吡喃糖相同。呋喃糖与吡喃糖相比,不同构象之间的能垒相差很小。在溶液中,由于构象之间的快速互变,难以确定平衡时的优势构象。



除了糖环的构象之外,糖苷键也有一定的稳定构象,从而决定寡糖、多糖和糖缀合物的三维结构,这种三维结构是表现其功能所必需的。对于一个二糖来说,两个糖环的相对取向由两个转角 ϕ 和 ψ 控制,如果此二糖以伯羟基相连,如以六碳吡喃糖的 6-位羟基相连,C_5—C_6 单键的转角 ω 是另一个控制二糖构象的因素。单键的旋转受两端取代基空间范德华力的影响,因而有其稳定的构象。对于糖苷键的取向(ϕ 转角),却主要受所谓的"外-异头碳效应"(exo-anomeric effect)控制[11,12]。外-异头碳效应的本质与前面提到的异头碳效应是相同的,可理解为当 $O_{1'}$ 的孤对电子占有轨道与 $C_{1'}$—$O_{5'}$ 键的 δ^* 轨道反平行时可发生 $n \rightarrow \delta^*$ 共振而能量有利(图 11-4)。

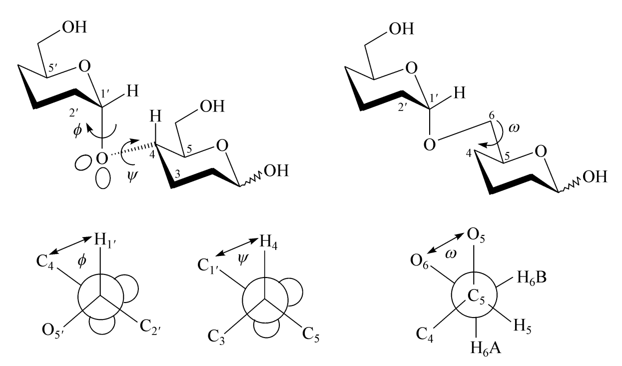


图 11-4　决定糖苷键构象的转角和外异头碳效应

第三节　天然存在的碳水化合物

天然存在的碳水化合物包括单糖、寡糖、多糖以及各种糖缀合物,它们存在于所有的生物中。现已鉴定的单糖超过 250 多种,但以游离形式存在的单糖是极少的。以游离形式存在的寡糖也很少,它们主要以与其他非糖配基(aglycone)共价

结合的形式存在。许多多糖在分子中也连有非糖成分。因此，在研究碳水化合物的时候，常常需要考虑非糖配基，特别是非糖配基与糖的连接方式。在这里，我们仅仅关注糖的部分。

关于碳水化合物的命名，如果按照有机化合物的系统命名规则，将非常复杂。所以，在碳水化合物的描述中，经常使用俗名。所有的三碳到六碳糖都由俗名来表示，其他糖类化合物的命名则主要建立在这些单糖俗名的基础上。详细命名可参考 IUPAC 规则[13,14]。

一、天然存在的单糖

D-葡萄糖是最重要的单糖，是绿色植物光合作用固定 CO_2 的储能产物，也是动物重要的能量物质。在人的血液中，每升含 0.5~1g 葡萄糖，其含量的微小变化都有可能引起细胞的损伤。葡萄糖除了提供能量，也是动物生产其他分子的原料，如转化成 RNA 和 DNA 中的核糖和脱氧核糖，转化成膜酯中的甘油等。在动物体内，常见的单糖还有以下 10 种，即 D-甘露糖、D-半乳糖、D-*N*-乙酰氨基葡萄糖、D-*N*-乙酰氨基半乳糖、L-岩藻糖、D-木糖、D-葡萄糖醛酸、D-甘露糖醛酸、D-半乳糖醛酸、L-艾杜糖醛酸和唾液酸(包括 20 多种各种取代的神经氨酸)，它们都存在于各种糖缀合物。上述的糖醛酸主要存在于细胞间质的蛋白聚糖。

L-岩藻糖(Fuc)　　*N*-乙酰神经氨酸(NeuNAc)

在植物界，单糖的种类更多一些。动物中不存在的常见单糖有存在于某些多糖或糖苷中的 L-鼠李糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-芹菜糖和 D-奎诺糖等。在强心苷的寡糖中，含有大量的脱氧和甲基化单糖。

L-鼠李糖 (Rha)　　D-芹菜糖 (Api)　　D-奎诺糖 (Qui)

细菌脂多糖中含有两种高碳糖：L-甘油-D-甘露庚糖(Hep)和 3-脱氧-D-甘露辛酮糖酸(Kdo)。微生物的代谢产物中(主要指各种抗生素)往往含有各种结构的氨基单糖。

二、天然存在的寡糖

自然界中以游离形式存在的寡糖不多，大量存在的只有蔗糖、α,α-海藻糖

(trehalose)、乳糖和一些含有蔗糖单元的寡聚糖，如棉籽糖族寡糖和蔗果糖族寡糖等。

蔗糖　　**α,α-海藻糖**　　**乳糖**

蔗糖和海藻糖是通过两个单糖的半缩醛羟基失水而形成的，不再具有醛的还原性，不表现变旋作用，不能再和醇类形成糖苷，这种连接类型的寡糖称为非还原糖。而乳糖是通过一个单糖的半缩醛羟基与另一个单糖的非半缩醛羟基失水而形成的，仍具有醛的还原能力，表现变旋作用，可和醇类形成糖苷，这种连接类型的寡糖称为还原糖。

蔗糖在甘蔗和甜菜的汁中含量高达 16%，它是几乎所有高等植物在体内运输糖的形式，也是一种储能的形式。α,α-海藻糖在蕈类中的含量可达其干重的 15%，它在昆虫和酵母中有和蔗糖类似的功能，并且是昆虫的主要血型物质，在昆虫的血液中浓度达 2%。乳糖是哺乳动物乳汁中最主要的碳水化合物，在人乳中的含量约为 6%，牛乳中 4.5%。在乳汁中还含有一些以乳糖为还原端的寡糖，有保护新生儿对抗微生物感染的作用。

大量的结构复杂多样的寡糖则以共价键连接于各类非糖分子构成大量的糖苷化合物和糖缀合物。

几乎所有的细胞外蛋白质是糖蛋白，其中糖的含量差别很大，如在卵清蛋白中只含有一条寡糖链，约占总相对分子质量的 3%，而在绵羊颌下腺黏蛋白中约含有 800 条二糖链，约占总相对分子质量的 50%。糖蛋白按寡糖与蛋白的连接方式可分成两类：*N*-连接糖蛋白的糖链连于蛋白的天冬酰胺残基(Asn)的侧链酰氨基；*O*-连接糖蛋白的糖链连于蛋白的丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基的侧链羟基。后来也发现了一些具有其他连接方式的糖蛋白。*N*-连接糖蛋白的糖链通常以一个核心五糖与蛋白相连，即 Manα1→6(Manα1→3)Manβ1→4Glc*N*Acβ1→4Glc*N*Acβ1→Asn，而 *O*-连接糖蛋白有较多类型的核心寡糖结构。虽然糖蛋白的核心结构有限，但外周取代的寡糖变化很多，构成极大的多样性。

动物体内的糖脂主要是鞘糖脂，由糖链和神经酰胺组成，神经酰胺由一条长链的鞘氨醇和一条脂肪酸链组成。有的糖链很短，如脑苷脂仅有一个半乳糖或葡萄糖；有的糖链很长，如巨糖脂的糖链是 20~30 聚的寡糖。大部分的糖链含 4 个左右的糖基，主要是葡萄糖、半乳糖和 *N*-乙酰氨基半乳糖，并在外端连有一个或多个唾液酸。

糖脂定位于细胞膜和内膜,和定位于膜的糖蛋白一样,其糖链伸展于膜的外侧,为细胞筑成一层厚厚的糖衣。这条糖衣的一些处于外周非还原端的寡糖往往是识别位点,如抗原特异性的血型决定簇寡糖。

植物中大多数的二次代谢产物都有糖苷化的存在形式,一个主要的原因是增加非糖分子的水溶性,从而有利于在体内的输运。其中氰苷、强心苷、皂苷和鞣质在天然产物著作中经常独立成章;其他的植物糖苷则在讲述各非糖部分时或多或少地提及,如黄酮苷、花青素苷、蒽醌苷、木脂素苷等。在此,仅概括植物糖苷的一些重要特点:

1) 植物糖苷中最常见的组成单糖是葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖和半乳糖。

2) 植物糖苷中的糖苷键均为 1,2-反式糖苷键,强心苷中 2-脱氧糖糖苷键例外。

3) 植物糖苷中皂苷的糖链最为复杂和多样,1 个分子中可以带有 3 条糖链,糖链可以是四糖、五糖或更长的寡糖;其次是黄酮苷(包括花青素苷),其中三糖和四糖也较常出现。

4) 其他植物糖苷中的糖链较为简单,如其他萜类(包括单萜、倍半萜、二萜、胡萝卜素和柠檬酸等)、芥子素(硫苷)和氰苷等,有许多只含一个单糖,并且往往是葡萄糖。

5) 对于芳香类化合物,如黄酮、香豆素和蒽醌等,既存在糖与酚羟基相连的 *O*-糖苷,又存在糖与苯环碳相连的 *C*-糖苷。

6) 植物糖苷的糖链常常被一些酰基所修饰。

7) 植物糖苷是种属特异性的,因而可作为植物分类的参考。

8) 植物糖苷的糖链是苷元特异性的,反映了植物体内糖基转移酶对苷元的选择性。

此外,以苯乙素苷为例说明植物糖苷的另外两个特点:

1) 一个植物糖苷可能存在于许多植物中;

2) 一种植物往往含有一系列的同种类型的糖苷,在结构上仅有微小差别。

苯乙素苷的苷元为通常是二羟基取代的苯乙醇,糖上还带有苯丙酰基类化合物取代基,因此也称为苯丙素苷[15,16]。第一个苯乙素苷是 1968 年从玄参科毛蕊属植物(*Verbascum sinuatum* L.)中分离的毛蕊花糖苷(verbascoside)。至今,毛蕊花糖苷已从 14 个属 60 多种植物中分离得到。在玄参科(Scrophulariaceae)地黄属植物 *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea* 的根中已分离得到了 17 个苯乙素苷化合物(图 11-5)。

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
1	H	H	H	H	OH	OH
2/3	H/Ac	Rha	Cf	H	OH	OH
4/5	H	Rha	H	H/Cf	OH	OH
6	H	Rha	Cf	H	OH	OH
7	H	Rha	Cf	H	OH	OH
8/9	H	Rha	Fr/*c*-Fr	H	OH	OMe
10	H	H	H	Xyl	H	H
11	Xyl	H	H	H	H	H
12/13	H	Rha	Fr/*c*-Fr	Gal	OH	OH
14/15	H	Rha	Fr/*c*-Fr	Gal	OH	OMe
16/17	H	Rha	Cm/Cf	Gal	OH	OH

图 11-5　地黄属植物 *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea* 根中的苯乙素苷

Rha =α-L-鼠李吡喃糖基; Xyl =β-D-木吡喃糖基; Gal = β-D-半乳吡喃糖基; Cf = 反式-咖啡酰基; Fr = 反式-阿魏酰基; *c*-Fr = 顺式-阿魏酰基; Cm = 反式-香豆酰基

三、天然存在的多糖

从量上讲,自然界的碳水化合物主要以多糖的形成存在。细菌、真菌和植物的细胞壁(可占整个细胞干重的30%)主要由多糖组成,动物细胞间质也含有大量的多糖。这些多糖的一个首要的功能是维持细胞的稳定结构。植物淀粉、果聚糖和动物糖原等则是能量储存物质。

多糖是高分子化合物,对其结构的研究做不到像对小分子那样精确,而只能描述一些结构上的特点,如分子大小(平均相对分子质量或相对分子质量分布)、单糖组成和单糖连接方式等。由一种单糖组成的多糖叫同多糖;由多种单糖组成的多糖叫杂多糖,不过大多主要只含两三种单糖;还有一些多糖则共价地结合了脂、肽或蛋白等。另外,多糖还可能带有其他的取代基团,如酰基、甲基、丙酮酸、硫酸基、磷酸基等。

一般认为一个多糖总具有一个重复结构单元或几个主要的重复结构单元。

直链淀粉是由250~ 300个D-葡萄糖通过α-1→4糖苷键连接而成的链状分子,因此,其最小重复单元是麦芽二糖。支链淀粉约含6000个D-葡萄糖残基,在α-1→4连接的长链上,通过α-1→6糖苷键形成侧链,侧链约含25个葡萄糖残基,仍以α-1→4连接。动物糖原主要存在于肌肉和肝脏,相对分子质量可达100 000 000(约含600 000个葡萄糖),并且比支链淀粉具有更高的支化度,有利于迅速水解提供葡萄糖。

纤维素是植物细胞壁中最主要的物质,由8000个左右的D-葡萄糖通过β-1→4糖苷键连接而成的链状分子,其最小重复单元是纤维二糖。

几丁质是昆虫和甲壳动物甲壳中的主要物质,故又称为甲壳素,也是真菌细胞

壁的常见成分。几丁质由 D-N-乙酰氨基葡萄糖通过 β-1→4 糖苷键连接而成,其最小重复单元是几丁二糖。

麦芽二糖　　纤维二糖　　几丁二糖

琼脂是藻类中的一种半乳聚糖。红藻中的半乳聚糖有两个基本的重复二糖单位,即-D-Gal$p$β(1→3)-D-Galα-(1→3)-和-D-Gal$p$β(1→3)-L-Galα-(1→3)-,其中的半乳糖残基可能被甲基化、硫酸化、3,6-缩水和 4,6-丙酮酸化等。

果胶(pectin)是高等植物初级细胞壁和相邻细胞间紧密联合的一类多糖,相对分子质量在 10 000~ 400 000 之间,大多的果胶具有 α-1→4 连接的 D-半乳糖醛酸的主链,羧基可有不同的甲酯化度,并可能含有其他多种单糖残基,如 L-鼠李糖、D-木糖和 L-阿拉伯糖等,其精细结构十分复杂。

动物细胞间质中的多糖主要是糖胺聚糖(glycosaminoglycan),大多数通过一个核心三糖[→3]Gal$p$β(1→3)-Gal$p$β(1→4)-Xyl$p$β(1→Ser/Thr)与蛋白质共价相连,称为蛋白聚糖(proteoglycan)。糖胺聚糖的主要结构特点列于表 11-1。

表 11-1　糖胺聚糖的主要结构特点

名称	相对分子质量 (× 10^3)	重复二糖单位	硫酸基取代度/每二糖单位	是否连接蛋白
透明质酸	~ 8000	-GlcAβ(1→3)-GlcNAcβ(1→4)-	0	否
硫酸软骨素	5~ 50	-GlcAβ(1→3)-GalNAcβ(1→4)-	0. 2~ 2. 3	是
硫酸皮肤素	15~ 40	-GlcAβ(1→3)-GalNAcβ(1→4)-和 -IdoAβ(1→3)-GalNAcβ(1→4)-	1. 0~ 2. 0	是
硫酸角质素	4~ 19	-Galβ(1→4)-GlcNAcβ(1→4)-	0. 9~ 1. 8	是
硫酸肝素	5~ 12	-GlcAβ(1→4)-GlcNAcα(1→4)-和 -IdoAβ(1→4)-GlcNAcα(1→4)-	0. 2~ 2. 0	是
肝素	6~ 25	-GlcAβ(1→4)-GlcNAcα(1→4)-和 -IduAβ(1→4)-GlcNAcα(1→4)-	2. 0~ 3. 0	是

细菌细胞壁中的胞壁质(murein)约占革兰氏阳性菌总质量的 50%,占革兰氏阴性菌的 10%。其中多糖的重要重复二糖单位是[GlcNAcβ(1→4)-MurNAcβ(1→4)],通过其中乳酸羧基形成肽链相互交联形成网状结构,其中的肽链含有多种非天然氨基酸,以对抗蛋白酶的水解。

脂多糖(lipopolysaccharide)是细菌细胞壁中另外一类重要的物质,具有强烈

的抗原性。其结构非常复杂,包括 Lipid A、内核心、外核心结构和 *O*-抗原多糖。

也有一些多糖完全缺乏一定的重复结构单元。例如,属于半纤维素的 D-葡萄-D-甘露聚糖,其中葡萄糖与甘露糖的比例约为 1∶3,以β(1→4)糖苷键连接,但两种单糖残基的分布没有规律,另外还含有少量半乳糖形成侧链。

第四节　碳水化合物的结构研究

由于碳水化合物结构的多样性、立体化学的复杂性、天然存在的微观不均一性以及难以结晶等特点,其分离纯化和结构鉴定是一项艰巨的工作。现在的结构分析手段相比以前已有了天翻地覆的变化,对碳水化合物的分离分析已越来越方便。其中最重要的进步是各种高效液相色谱、核磁共振、质谱以及各种生物学方法的发展,如凝集素亲和层析、凝集素和抗体检测一定结构的寡糖、糖苷外切酶和内切酶鉴定各种糖苷键等。需要指出的是:

1) 碳水化合物特别是糖缀合物的分离鉴定仍是极具挑战性的工作,目前只有为数不多的先进实验室能进行;

2) 各种糖苷和糖缀合物的分离纯化必须考虑非糖组分的性质,在结构鉴定时可能必须选择条件断开糖和非糖组分,以分别进行结构研究;

3) 古老的化学方法,如甲基化分析、完全和部分酸水解等在现在仍是鉴定多糖和寡糖结构的不可或缺的方法;

4) 未来的进步在于生物学手段和谱学手段的联用,如近期出现的多种糖苷水解酶和质谱联用解析 *N*-连接寡糖和肝素类寡糖的结构。

一、碳水化合物的高效液相色谱

用于碳水化合物分离的高效液相色谱一般使用反相柱,如 C_{18} 柱和氨基柱等,使用水或水与乙腈和甲醇的混合溶剂作洗脱剂,样品按极性大小分离,如三糖比二糖先流出。凝胶渗透色谱(GPC)则按分子的大小来分离样品,相对分子质量大的先流出,可用于多糖和糖缀合物的脱盐、纯化和相对分子质量的测定。

由于碳水化合物大都没有强的紫外吸收,过去只能使用示差检测,但示差检测的灵敏度低,只有紫外检测的 1/1000 左右,并且不稳定。或对样品进行紫外或荧光标记,但化学标记需要额外的工作量。20 世纪 80 年代以后出现了商品化的蒸发光散射检测器(ELSD)基本解决了碳水化合物的检测问题。ELSD 检测包括三个过程:①雾化。色谱柱流出物通过针头式的细导管进入雾化器,在导管的尾部与气体混合喷成均匀的雾滴。②蒸发。雾滴经过加热的漂移管,流动相被蒸发,溶质颗粒形成极细的薄雾。③溶质颗粒在检测池中发生光散射作用,经光电倍增管放大成信号输出。

20 世纪 80 年代以后逐步建立的使用阴离子交换层析柱联用脉冲安培检测器(HPAEC-PAD)来分离分析碳水化合物的方法(商品化的 Dionex 系统)也越来越受重用[17]。该方法是利用糖的多羟基性,即糖具有弱酸性,在强碱溶液中(pH 为 12~14)可部分或全部离子化。一般使用 NaOH 和 NaOAc 的混合水溶液进行洗脱,离子化程度越小,在柱中的保留时间越短。PAD 可检测小于 0.1ng 的样品。

二、碳水化合物的核磁共振分析

较小的碳水化合物(相对分子质量小于 2000),包括大多数的植物糖苷的结构用现在的核磁共振(NMR)技术可完全确定其结构。NMR 还能提供分子在溶液中的构象和动力学方面的大量信息,这是其他方法所不能的。NMR 的缺点是需要一定量的较纯的样品,在傅里叶变换的 500 兆核磁上做二维氢谱需要至少 250nmol 的样品,做碳谱则需要其 10 倍量的样品。要获得这样的量,对一些糖缀合物来说还是非常不容易的。表 11-2 给出了 NMR 能提供的参数及相关的碳水化合物的结构信息。

表 11-2 用于碳水化合物结构解析的 NMR 参数

NMR 参数	结构信息
化学位移,NOE,自旋偶合(^{13}C-^{1}H)	连接位点
化学位移,自旋偶合(^{1}H-^{1}H、^{13}C-^{1}H)	异头碳构型
自旋偶合(^{1}H-^{1}H、^{13}C-^{1}H、^{13}C-^{13}C)	单糖残基构象
核自旋弛豫(T_1、T_2),NOE、自旋偶合(^{13}C-^{1}H、^{13}C-^{13}C)	糖苷键构象(ϕ、Ψ)
自旋偶合(^{1}H-^{1}H、^{13}C-^{1}H)	羟甲基构象(ω)
核自旋弛豫(T_1、T_2),NOE	糖链运动和动力学性质

碳水化合物的羟基因其宽的信号和化学位移的可变性,一般不适用于结构研究,常常通过重水交换把它们除去。糖环碳上大部分质子的化学位移由于受羟基的屏蔽作用而位于 3~4ppm 的狭小区间,对于较大的寡糖,信号重叠则非常严重;其中的同核^{1}H-^{1}H 偶合也只有在高场(通常大于 400 兆)NMR 谱仪上得以成一级相关。不过,一些特定的糖环质子和取代官能团质子的信号可以比较方便地加以辨认。特别是异头碳质子 H-1 的化学位移总是处于较低场(4.5~5.5ppm),并且只受 H-2 的偶合而成二重峰。其他较容易辨认的信号包括:①甘露糖的 H-2 和 H-3;②唾液酸的 H-3;③岩藻糖的 H-5 和 CH_3;④半乳糖的 H-3 和 H-4;⑤ *N*-乙酰氨基糖的乙酰基 CH_3 等[18,19]。

相邻质子的偶合常数是其二面角的函数,这一点对归属糖环质子和判别糖环

构型非常重要。偶合常数 J 与其二面角 ϕ 的相互关系为

$$J = J_0 \cos^2\phi - 0.28$$

当 ϕ 在 0～90°之间，J_0 值为 8.5Hz；当 ϕ 在 90～180°之间，J_0 值为 9.5Hz。换句话说，在吡喃糖环系统，当 $\phi = 60°$，也就是相邻质子处于直立键-平伏键或平伏键-平伏键方向时，偶合常数在 1～4Hz 之间；当 $\phi = 180°$，也就是相邻质子处于直立键-直立键方向时，偶合常数在 6～10Hz 之间。解析图谱时一般先找出上述的一些容易辨认的质子信号，如异头位质子，再通过相同偶合常数的信号来确定其邻位质子；对于重叠严重的谱图则通过去偶和二维谱来归属所有的信号。

复杂寡糖和多糖的氢谱信号难以提供较多的有用的结构信息，而质子去偶的碳谱信号的化学位移范围宽达 300ppm，从高场到低场分别是脂肪烃碳、糖环碳（60～90ppm）、糖基异头碳（～100ppm）、芳烃碳和双键碳、羰基碳等，具有较好的分辨，并且有许多单糖、寡糖和多糖的碳谱已列成表，可以用于方便的对比。与质子共振情况相对应，碳原子的化学位移也受相关原子的电子密度影响，异头碳的电子密度相对较低，其信号就要比其余碳原子的信号更低场。碳原子的取代基发生变化，其碳谱也非常敏感地发生变化，如果碳原子所连的羟基被氢取代（脱氧），则该碳的化学位移大大移向高场。取代基不同的空间排列及对邻位碳的取代都对化学位移产生很大的影响，如平伏键的取代变为直立键的取代，该碳的化学位移将移向高场，这种影响对异头碳特别明显。对邻位碳的取代基从平伏键变为直立键时其化学位移大多移向高场，相反，如果连到碳上的氢原子对羟基出现 1,3-二轴关系时，其化学位移也移向高场[20,21]。

除了单糖及其衍生物，其他寡糖或糖苷的结构解析往往依赖各种二维核磁共振技术。表 11-3 列出了用于碳水化合物结构解析的 2D-NMR 技术和谱图二维的参数，信号的大小一般以等高线表示。

表 11-3　用于碳水化合物结构解析的 2D-NMR

2D-NMR 技术	F_1 轴参数	F_2 轴参数
同核 2D J 谱	J_{HH}	$\delta(^1H)$
COSY, DQF-COSY, TQF-COSY, HOHAHA(TOCSY), NOESY	$\delta(^1H)$	$\delta(^1H)$
HETCOR, HMQC, HMBC	$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$

HMQC(heteronuclear multi quantum coherence) 谱给出直接相连的 ^{13}C-^1H 间的相关关系（$^1J_{CH}$），可找出与异头碳质子相连的碳的信号以及糖基上每个质子所连接的碳的信号。DQF-COSY(double quantum filter correlated spectroscopy) 和 TOCSY(total correlated spectroscopy) 给出 ^1H-^1H 的邻位相关（$^2J_{HH}$）和远程相关（$^3J_{HH}$、$^4J_{HH}$…），通过邻碳质子偶合和异头碳与同一糖基的所有质子的相关关

系,可从已知的异头碳质子开始寻找邻位的质子和整个糖基所连接的所有质子。NOESY(nuclear overhauser effect spectroscopy)揭示了每个糖基内和糖基间的质子空间相关关系的奥氏核效应,提供了每个糖基质子之间的立体关系和糖基间的连接关系和部位。糖苷键之间如何连接的进一步证据可从 HMBC(heteronuclear multi-bond connection)谱来获得,它提供了^{13}C-^{1}H 之间的远程相关关系($^2J_{CH}$、$^3J_{CH}$),通过异头碳和糖基配体中质子或异头碳质子和糖基配体中的碳之间的远程 C-H 相关,可找出该异头碳所连接的糖基及其部位。

三、碳水化合物的质谱分析

质谱(MS)技术在近年的发展速度甚至超过了核磁共振,正成为越来越重要的结构分析手段。解决寡糖和糖缀合物快速、微量的结构分析问题也正寄希望于由其他技术辅助的新的质谱技术[22]。

质谱测定的是分子离子或碎片离子的质量(严格地说是质荷比 m/z),因而可以直接给出精确的相对分子质量以及寡糖连接的一些信息,如断裂一个末端的葡萄糖给出 162u 和 $M-162$u 的碎片峰;断裂一个 *N*-乙酰氨基葡萄糖则给出 203u 和 $M-203$u 的碎片峰;断裂一个岩藻糖则给出 146u 和 $M-146$u 的碎片峰等。但是,质谱不能直接给出立体化学的信息,如不能判别 162u 的碎片峰是属于葡萄糖、甘露糖、还是其他六碳糖,也不能获知此六碳糖是吡喃构型还是呋喃构型,是α-连接还是β-连接。因此,必须联用其他方法来确定其中的立体化学,如使用一系列糖苷水解酶。不过,串联质谱(tandem mass spectrometry)的使用和对糖的断裂规律的更深入了解有可能通过质谱得到糖的立体化学的信息,这一方面的研究还刚刚开始。

ESI 作为一种新的电离技术是对大分子化合物相对分子质量测定的重大突破。ESI 测定的相对分子质量可达 10 万,准确度达 0.01%~0.05%。除了给出精确的相对分子质量,还能提供糖基断裂的碎片信息,在天然寡糖和糖缀合物的结构研究中正在发挥越来越大的作用。ESI 是靠强的电场使样品分子从溶液液滴中解析出离子并进入到周围的气体中,这种分子离子往往带多个电荷,因此在 ESI 谱图上出现的往往是一组带不同电荷的分子离子峰,根据仪器记录下来的每个峰的质荷比及电荷数即可算出其相对分子质量值。由于从一组峰上可算出好多个相对分子质量值,它们之间会略有差别,通过计算机特定的程序处理,可找出最接近的相对分子质量值。测定寡糖和糖缀合物时,除了得到$[M+H]^+$基峰,也常常得到$[M+Na]^+$、$[M+K]^+$和$[M+2Na]^+$等一系列加成离子峰;相对分子质量小于 1000 时出现$[2M+Na]^+$和$[2M+K]^+$峰,而相对分子质量大于 1000 时则出现双电荷离子,利用这些可能出现的谱峰有助于判断所测试的化合物的结构。

MALDI 技术与 ESI 几乎同时问世于 20 世纪 80 年代末。由于技术上的要

求，往往用飞行时间检测器（TOF）来检测产生的离子，而称为 MALDI-TOF 质谱。MALDI-TOF 质谱测定的蛋白质相对分子质量已达 35 万，准确度达 0.05%～0.1%。其中的样品不受添加剂、缓冲液和盐类的影响。其灵敏度是各类电离方式中最高的，只需飞摩至皮摩级的样品量。MALDI 的基本原理是利用激光脉冲辐射分散在基质中的样品使其解吸形成离子。其中选择合适的基质是十分重要的，目前一般使用的有苯甲酸衍生物、芥子酸和肉桂酸衍生物等。对于蛋白质和糖蛋白，MALDI 除了给出强的$[M+H]^+$峰，也常常给出较弱的双电荷或多电荷的离子峰，而对于中性寡糖，往往仅给出单一的$[M+Na]^+$峰。

第五节　碳水化合物的化学合成

天然碳水化合物主要以糖缀合物的形式存在并起作用，如糖蛋白、糖肽和植物糖苷等。糖缀合物中的糖链又常以“糖型”的形式存在，构成糖缀合物的微观不均一性。因此，从天然来源获得结构单一的糖缀合物是非常困难的，化学合成就显得尤为重要。

一、糖苷键的化学合成

碳水化合物的化学合成包括以天然碳水化合物（主要是单糖）为原料的有机合成，主要是利用其中丰富的手性中心[23]；也包括利用其他小分子合成天然的单糖，主要是合成少见的氨基糖和脱氧糖[24]；最主要的内容是合成天然的寡糖及缀合物，如糖肽、糖脂和植物糖苷等。因而其中的化学核心是糖苷键的合成，即糖的异头位缩醛的合成（图 11－6）。直接脱水生成糖苷键的反应需要强烈的条件，因而通常先用离去基团（X）来活化异头位，制备成糖基给体，再在促进剂的作用下生成糖苷化产物。影响糖苷化反应的主要因素有：①糖基受体的性质，如羟基的活性、位阻和受体分子上其他官能团的影响等；②糖基给体的性质，如离去基团 X、2-位

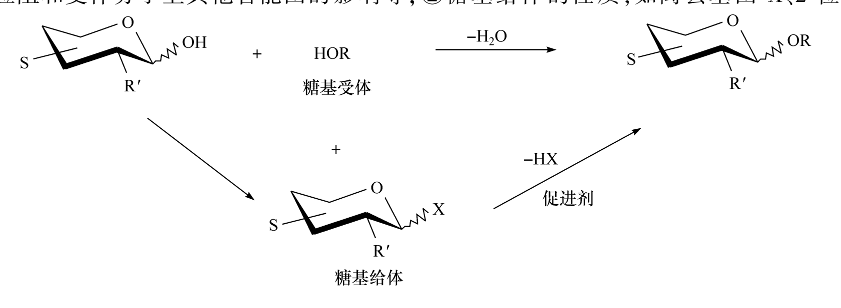


图 11－6　糖苷键的化学合成

取代基 R′,其他位取代基 S;③反应条件,如促进剂、溶剂、温度等。看似简单的这一化学转化却蕴含着复杂的信息 。以下分几个方面来讨论。

(一) 糖基给体[25]

虽然影响糖苷化反应的因素很多,但其中影响最大的是糖基给体的异头位离去基团,它也决定了糖苷化反应的条件,如促进剂和反应温度等。因此,糖苷化反应一般以糖基给体异头位离去基团的类型来分类。然而,任何一个糖苷化方法的适用性都是有限的,难以满足糖苷键的多样性。目前最常使用的糖基给体是糖基三氯乙酰亚胺酯、硫苷和糖基卤化物。其他糖苷化方法基本上只有个别研究小组使用。下面就主要的糖苷化反应做一些介绍。

(1) 糖基氯化物和溴化物[26,27]

使用糖基氯化物和溴化物作为糖基给体,银盐和汞盐作促进剂的糖苷化反应被称为 Koenigs–Knorr 反应,发现于 1901 年,是 20 世纪 80 年代以前最重要的糖苷化反应。后来发现也可使用 Bu_4NBr 等作为促进剂,以避免使用有毒易爆的银盐和汞盐。在 Koenigs–Knorr 反应的长期应用中也发现加入质子捕捉剂(如 2,4,6–三甲基吡啶和四甲基脲)和加入干燥剂(如分子筛)可以大大减少副产物的生成,这也成了以后糖苷化反应的标准操作。

(2) 糖基三氯(氟)乙酰亚胺酯[28]

1980 年,Schmidt 发展了糖基三氯乙酰亚胺酯作为给体的糖苷化反应[29],这是糖苷键化学合成上的一个重要进展。最近,糖基三氟乙酰亚胺酯也被用作糖基给体[30]。两者具有相当的活性[31,32],而且后者弥补了三氯乙酰亚胺酯给体不能用于唾液酸苷化的不足[33]。糖基三氯(氟)乙酰亚胺酯制备容易,稳定性较好,大多可通过柱层析纯化并保存数月。糖苷化反应可用催化量的 BF_3OEt_2 和 TMSOTf 等作为促进剂,条件温和,并对大多数的糖苷键的合成能得到较好的产率。因此,已成为目前合成糖苷键,特别是合成复杂分子糖苷键的首选反应。在对抗肿瘤皂苷 OSW–1 的合成中,二糖与苷元的连接就使用了这一糖苷化方法(图 11–7)。[34]

(3) 硫苷[35]

虽然 Ferrier 等在 1973 年就尝试了以 $HgSO_4$ 为促进剂、以硫苷为给体的糖苷化反应。但是,只有在 10 多年以后,更温和的活化条件的发现才使硫苷成为广泛使用的糖基给体。现在常用的促进剂有 NIS/HOTf(AgOTf)、IDCP、DMTST 等。以硫苷作给体的糖苷化反应对许多糖苷键的形成非常有效,如在树脂糖苷 tricolorin A 的合成中(图 11–8),二糖硫苷(**5**)与二糖大环内酯受体(**4**)在 NIS/AgOTf 的促进下实现糖苷化偶联,以 86%的产率得到全保护的目标分子前体(**6**)[36]。硫苷最突出的优点是它们的稳定性,它们能容忍许多保护基操作和其他反应条件。这一特点在寡糖和糖缀合物的高效合成策略中扮演了非常重要的角色。

图 11－7　OSW–1 的合成

图 11－8　树脂糖苷 tricolorin A 的合成

(4) 糖基氟化物[37]

与糖基氯化物和溴化物相比,糖基氟化物非常稳定。1981 年,Mukaiyama 等用 $AgClO_4/SnCl_2$ 作促进剂首次把糖基氟化物用作糖基给体[38]。此后,许多促进剂被开发出来,加上其稳定性,糖基氟化物遂成为一种颇为常用的糖基给体。

(5) 糖烯[39]

糖烯的一种用途是用来合成 2–位脱氧糖苷。主要是通过亲电加成直接合成糖苷化合物,或先合成 2–位杂原子基团(如 I、Br、SR 和 SeR 等)取代的糖基给体,

最后脱去2-位取代基。Danishefsky小组从1989年开始系统地研究了利用糖烯的糖苷化方法,他们用过氧丙酮(DMDO)把糖烯转化为1,2-内醚糖,再以1,2-内醚糖为给体在$ZnCl_2$的促进下进行糖苷化反应。该方法的明显优点是糖烯又可作为受体进行反应,生成的寡糖可再转化为相应的1,2-内醚糖,然后再进行下一步糖苷化反应。

(二) 寡糖合成中的区域选择性

每个糖基含有多个反应活性相差不大的羟基,区域选择性糖苷化基本上不能实现(除了在极少数例子中),因而原则上必须依靠复杂的保护基策略来保护所有不参与反应的羟基。在复杂寡糖的合成中保护基操作一般占总工作量的80%以上。保护基也不仅仅起保护的作用,在很多时候还影响甚至控制了反应的进程,是合成成功与否的重要因素。由于保护基化学的复杂性和特殊性,在此不进行讨论,读者可参考有关专著和综述[40~42]。

(三) 糖苷化反应的立体选择性

完全立体选择性的糖苷化反应主要由邻位(2-位)基团来控制,由此可分成以下三种情况来讨论。

(1) 1,2-反式糖苷键的合成

1,2-反式糖苷键的合成是最容易控制的糖苷化反应,只要2-位带有酰基保护基,1,2-反式糖苷化产物往往是唯一的产物。反应被认为是通过以下途径进行的(图11-9)[43]。

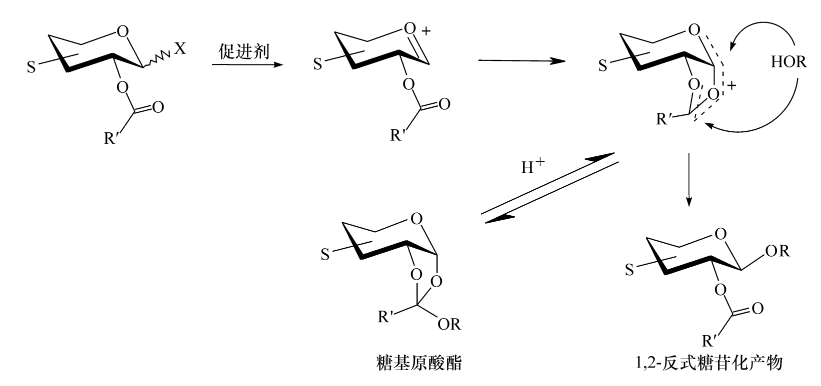


图11-9 通过邻基参与合成1,2-反式糖苷化产物

其中一个主要的副反应是原酸酯的生成,这在不活泼羟基的糖苷化反应中常

常遇到。糖基原酸酯在酸性条件下不稳定,可以转化成糖苷化产物,但同时也往往产生出其他多种副产物。增大 R′ 基团是抑制原酸酯生成的一个方法。

(2) 1,2–顺式糖苷键的合成

2–位取代基无论通过参与作用或空间影响,都不利于 1,2–顺式糖苷键的形成。以往选择性合成 1,2–顺式糖苷键的方法只能利用吡喃环的异头碳效应,即 α–糖苷化产物比相应的 β–产物稳定,故热力学控制的产物以 α 为主。但是,一方面这种控制的程度有限,另一方面甘露糖构型的 1,2–顺式产物是热力学不稳定的 β–异构体,从而无法控制。进而发展了原位异头位异构(*in situ* anomerisation)或溶剂参与等方法,但适用的范围非常有限[27]。近来发展的利用 2–位取代基的输送的方法试图解决这一问题[44~46]。

(3) 2–位脱氧糖糖苷键的立体选择性合成

失去了 2–位基团,2–位脱氧糖糖苷键的立体选择性无从控制,同时其糖苷键也较不稳定。在一般的糖苷化条件下,热力学稳定的 α–糖苷化产物为主要产物。β–糖苷化产物只能通过迂回的路线来合成,即先在 2–位安上有邻基参与作用的基团,等立体选择性地合成了 β–糖苷键后再行脱除。制备 2–位特殊取代基的给体往往需要多步操作。通过硫苷的 1,2–迁移同时糖苷化则提供了一条简便的合成路线。图 11–10 给出用 2,3–*O*–硫代羰酰酯硫苷作给体合成 2–脱氧–β–糖苷的示意图[47,48]。

图 11–10　通过 1,2–硫迁移同时糖苷化合成 2–脱氧–β–糖苷

(4) 硫糖苷、氮糖苷和碳糖苷的合成

硫糖苷、氮糖苷的合成与通常的氧糖苷的合成类似,但不尽相同,而碳糖苷的合成在化学本质上不同,是碳–碳键的合成。故不在此做讨论,读者可参考最近的综述和专著[49,50]。

二、糖苷键的酶促合成[51]

上述糖苷键的化学合成需要控制复杂的区域选择性和立体选择性,因而费时费力。相比之下,酶促合成具有很大的优势。然而,糖苷键的酶促合成有其自身的复杂性:①生物体中合成糖苷键的糖基转移酶大多是定位于内质网和高尔基体等细胞内膜的膜蛋白,得来不易,且不稳定,使用基因重组技术也较难获得;②糖基转移酶对底物结构的专一性非常强,一个糖基转移酶一般只能合成一种糖苷键;③糖

基转移酶利用的给体主要是糖基焦磷酸核苷,在体内由多种酶的作用来合成,体外制备不容易。不过,由于基因重组技术的进步,越来越多的糖基转移酶的获得变得容易,因此寡糖和糖缀合物的酶促合成在近年有了很大的发展。图 11－11 中 Wong 等对三糖 NeuAα2,3Galβ1,4GlcNAc 的合成是其中代表性的例子[52]。在合成中,唾液酸给体唾液酸单磷酸胞苷(CMP-NeuAc)在多种酶的作用下再生而循环使用,避免了使用昂贵的给体,并消除了给体和产物胞苷单磷酸(CMP)对糖苷化反应的抑制作用。

图 11－11　对三糖 NeuAα2,3Galβ1,4GlcNAc 的合成

E^1 =α-2-3 唾液酸转移酶;E^2 = 核苷单磷酸激酶;E^3 =丙酮酸激酶;E^4 = CMP-唾液酸合成酶;E^5 = 焦磷酸酶

由于能获得的糖基转移酶的数量在目前还非常有限,糖苷键酶促合成的应用还很少。另外,非天然结构的寡糖类似物的合成难以用酶促的方法进行,而合成这些结构对于发展诸如糖基转移酶抑制剂等药物是必要的。因此,化学方法和酶促方法的联合使用是合成复杂寡糖和糖缀合物的现实手段。

三、合成实例

三糖皂苷(**12**)是从蒜属植物(*Allium vineale*)中分离得到的一个结构简单的甾体皂苷。图 11－12 所示的合成路线使用了最常用的寡糖合成方法[53,54]。合成中主要反应的具体实验操作包括:①糖基三氯乙酰亚胺酯(**7**)的制备;②硫苷(**8**)的制备;③以三氯乙酰亚胺酯(**7**)为给体的糖苷化反应制备二糖(**9**);④以二糖硫苷(**9**)为给体与(**10**)进行糖苷化反应,制备三糖苷(**11**)。

【例 11－1】　2,3,4,6-四-*O*-苯甲酰基-α-D-葡萄吡喃糖基三氯乙酰亚胺酯(**7**)的制备(图 11－13)

图 11－12　三糖皂苷(**12**)的合成

图 11－13　**7** 的制备反应

将 D–葡萄糖(15g,83. 2mol)溶于无水吡啶(125mL)。在冰浴下,滴加苯甲酰氯(60mL,6eq)。室温下搅拌 3h 后,加入甲醇(10mL)中止反应。反应液倒入冰水(500mL),有白色固体析出,过滤,水洗数遍,烘干得白色固体 1,2,3,4,6–五–*O*–苯甲酰基–D–葡萄吡喃糖(**13**)(58g,100%)。

将 **13**(2. 0g,2. 8mmol)溶于无水四氢呋喃–甲醇(7∶3,100mL)。在 0℃下,通入氨气 20min。室温下搅拌 30min 后,反应液减压浓缩,硅胶柱层析纯化(石油醚∶乙酸乙酯为 4∶1),得白色泡沫状固体 2,3,4,6–四–*O*–苯甲酰基–D–葡萄吡喃糖

(**14**)(1.4g,82%)。

将 **14**(1.05g,1.8mmol)溶于无水二氯甲烷(10mL)。在 0℃ 下,滴加三氯乙腈(0.92mL,9.2mmol),然后加入 DBU 数滴。室温下搅拌 1h 后,反应液减压浓缩,硅胶柱层析纯化(石油醚∶乙酸乙酯为 4∶1),得白色泡沫状固体 **7**(1.24g,95%)。

【例 11-2】 乙基 2,3-*O*-异丙叉基-1-硫-α-L-鼠李吡喃糖苷(**8**)的制备(图 11-14)

L-Rha —Ac_2O→ **15** —EtSH, BF_3OEt_2→ **16** —NaOMe→ **17** → **8**

图 11-14 **8** 的制备反应

将带一份结晶水的 L-鼠李糖(9.7g,53.2mmol)和乙酸钠(6.4g,78.0mmol)溶于乙酸酐(90mL)。加热回流 10min,溶液变成澄清的红棕色。倒入冰水中,搅拌,放置过夜。乙酸乙酯提取 3 次,有机相依次用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,硅胶柱层析纯化(石油醚∶乙酸乙酯为 4∶1),得无色糖浆状 1,2,3,4-四-*O*-乙酰基-L-鼠李吡喃糖(**15**)(19.2g,100%)。

在氮气保护下,将 **15**(17.7g,53.2mmol)溶于无水二氯甲烷(100mL),加入乙硫醇(6mL,81.0mmol),在搅拌下滴加 $BF_3 \cdot OEt_2$(8mL,65.1mmol)。室温搅拌过夜。减压浓缩。用石油醚和乙酸乙酯重结晶得白色晶体β-异构体(2.4g)。再次重结晶得白色晶体乙基 2,3,4-三-*O*-乙酰基-1-硫-α-L-鼠李吡喃糖苷(**16**)(6.0g)。母液浓缩后用硅胶柱层析分离(石油醚∶乙酸乙酯为 2∶1),又得 **16**(6.0g,共 70%)。

将 **16**(4.0g,12.0mmol)溶于无水甲醇(40mL)。在室温下,加入催化量甲醇钠。搅拌 2h 后,加入阳离子树脂(H^+)中和,过滤,浓缩,得无色糖浆乙基 1-硫-α-L-鼠李吡喃糖苷(**17**)(2.5g,100%)。

将 **17**(0.57g,2.8mmol)溶于 2,2-二甲氧基丙烷(6.2mL)。室温下,加入对甲苯磺酸(47mg)。搅拌 1h 后,加入二氯甲烷稀释,依次用饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩,硅胶柱层析纯化(石油醚∶乙酸乙酯为 2∶1),得无色糖浆 **8**(0.67g,99%)。

【例 11-3】 乙基 2,3,4,6-四-*O*-苯甲酰基-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-2,3-*O*-异丙叉基-1-硫-α-L-鼠李吡喃糖苷(**9**)的制备

氩气保护下,将硫苷受体(**8**)(116mg,0.46mmol)、葡萄糖三氯乙酰亚胺酯给体(**7**)(450mg,0.60mmol)和 4Å 分子筛(500mg)溶于无水二氯甲烷(10mL)。室温搅拌 1h 后,冷却至 -78℃,滴加 TMSOTf 的二氯甲烷溶液(0.05mol/L,

0.92mL)。继续搅拌30min后,加入三乙胺(0.1mL)淬灭反应。过滤除去分子筛,减压浓缩,硅胶柱柱层析分离(石油醚∶乙酸乙酯为4∶1),得白色固体(**9**)(376mg,97%)。

【例11-4】　薯蓣苷元基2,3,4,6-四-*O*-苯甲酰基-β-D-葡萄吡喃糖基-(1→4)-2,3-*O*-异丙叉基-α-L-鼠李吡喃糖基-(1→4)-2,3-二-*O*-乙酰基-6-*O*-苯甲酰基-β-D-葡萄吡喃糖苷(**11**)的制备

氩气保护下,将受体(**10**)(127mg,0.17mmol)、二糖硫苷给体(**9**)(275mg,0.33mmol)和4Å分子筛(500mg)溶于无水二氯甲烷(8mL)。室温搅拌1h后,冷却至-30℃,加入NIS(90mg,0.40mmol),随后加入AgOTf(10mg,0.04mmol)。继续搅拌30min后,加入三乙胺(0.1mL)淬灭反应。过滤除去分子筛,减压浓缩,硅胶柱柱层析分离(石油醚∶乙酸乙酯为3∶1),得白色固体(**11**)(228mg,90%)。

参考书目

[1] Lehmann J. Carbohydrates: Structure and Biology. Stuttgart: Thieme, 1998

[2] Collins P, Ferrier R. Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products. Chichester: John Wiley & Sons, 1995

[3] Allen H J, Kisailus E C. Glycoconjugates: Composition, Structure, and Function. New York: Marcel Dekker Inc, 1992

[4] Ikan R. Naturally Occurring Glycosides. Chichester: John Wiley & Sons, 1999

[5] 吴东儒. 糖类的生物化学. 北京:高等教育出版社, 1987

[6] 张惟杰. 糖复合物生化技术研究. 杭州:浙江大学出版社, 1994

[7] 陈惠黎. 糖复合物的结构和功能. 上海:上海医科大学出版社, 1997

参考文献

[1] Dwek R A. Chem Rev, 1996, 96:683

[2] Varki A. Glycobiology, 1993, 3:97

[3] Lichtenthaler F W. Angew Chem, Int Ed Engl, 1992, 31:1541

[4] Durette P L et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1971, 26:49

[5] Leloir LF. Science, 1971, 172:1299

[6] Kornfeld R et al. Annu Rev Biochem, 1985, 54:631

[7] Hindsgaul O et al. Bioorg Med Chem, 1996, 4:1795

[8] Hindsgaul O et al. Science, 2001, 291:1163

[9] Tvaroska I et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1989, 47:45

[10] Juaristi E et al. Tetrahedron, 1992, 48:5019

[11] Lemieux R U et al. Can J Chem, 1969, 47:4427

[12] Praly J P et al. Can J Chem, 1987, 65:213

[13] IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature. Nomenclature of carbohy-

drates. Pure Appl Chem, 1996, 68:1919
[14] IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature. Nomenclature of carbohydrates. Carbohydr Res, 1997, 297:1
[15] Cometa F et al. Fitoterapia, 1993,195
[16] Jiménez C et al. Nat Prod Rep, 1994,591
[17] Marten D A et al. J.Chromatogr, 1991, 546:297
[18] Vliegelhart J F G et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1983, 41:20
[19] Vliegelhart J F G et al. Pure Appl Chem, 1981, 53:45
[20] Bock K et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1983,41:27
[21] Bock K et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1984, 42:193
[22] Venkataraman G et al. Science, 1999, 286:537
[23] Hanessian S. Total Synthesis of Natural Products: The "Chiron" Approach, Organic Chemistry Series. Oxford: Pergamon,1983
[24] Kirschning A et al. Synthesis, 2001, 507
[25] Toshima K et al. Chem Rev, 1993, 93:1503
[26] Wulff G et al. Angew Chem, Int Ed Engl, 1974, 13:157
[27] Paulsen H. Angew Chem, Int Ed Engl, 1982, 21:155
[28] Schmidt R R et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1994, 50:21
[29] Schmidt R R et al. Angew Chem Int Ed Engl, 1980, 19:731
[30] 俞飙等. Tetrahedron Lett, 2001, 42:2405
[31] 俞飙等. J Org Chem, 2002, 67:9099
[32] 张照军等. J Org Chem, 2003, 68:6309
[33] 蔡苏棠等. Org Lett, 2003, 5:3827
[34] 邓绍江等. J Org Chem, 1999, 64:202
[35] Garegg P J. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1995, 52:170
[36] 卢寿福等. Angew Chem, Int Ed Engl, 1997, 36:2345
[37] Shimizu M et al. Synthesis, 1998, 799
[38] Mukaiyama T et al. Chem Lett, 1981, 431
[39] Danishefsky S J et al. Angew Chem, Int Ed Engl, 1996, 35:1380
[40] Schelhaas M et al. Angew Chem, Int Ed Engl, 1996, 35:2056
[41] Kocienski P J. Protecting Groups. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1994
[42] Greene T W, Wuts P G M. Protective Groups in Organic Synthesis(3rd ed). New York: Wiley, 1999
[43] 杨尊义等. Carbohydr Res, 2000, 329:879
[44] Stork G et al. J Am Chem Soc, 1992, 114:1087
[45] Barresi F et al. J Am Chem Soc, 1991, 113:9376
[46] Ito Y et al. Angew Chem, Int Ed Engl, 1994, 33:1765
[47] 俞飙等. Org Lett, 2001, 3:377

[48] 俞飙等. Org Lett, 2002, 4:1919
[49] Levy D E, Tang C. The Chemistry of C-glycosides, Tetrahedron Organic Chemistry Series. Oxford: Pergamon, 1995
[50] Du Y et al. Tetrahedron, 1998, 54:9913
[51] Wong C H et al. Angew Chem, Int Ed Engl, 1995, 34:412, 521
[52] Ichikawa Y et al. J Am Chem Soc, 1991, 113:4698
[53] 俞飙等. Tetrahedron Lett, 1999, 40:8591
[54] 于海等. J Chem Soc, Perkin Trans, 2000, 1445

第十二章　黄酮类化合物

第一节　概　　述

黄酮类(flavonoids)化合物是在植物中分布非常广泛的一类天然产物,其在植物体内大部分与糖结合成苷类,小部分以游离态(苷元)的形式存在。绝大多数的植物体内都含有黄酮类化合物,黄酮类化合物在植物的生长、发育、开花、结果以及防菌防病等方面起着重要的作用。目前已有多本黄酮类化合物专著[1~7]问世,全面系统地介绍了各种黄酮类化合物。近10年来,黄酮类化合物的研究已倾向于其药用价值的开发,更多地涉及提取分离工艺的应用研究、黄酮类化合物的含量测定及制剂制备等。

一、黄酮类化合物的结构类型和分类

最早黄酮类化合物主要是指基本母核为2-苯基色原酮(2-phenyl-chromone)的一类化合物,现在则泛指两个苯环(A环与B环)通过中央三碳相互联结而成的一系列化合物。

根据中央三碳的氧化程度、是否成环、B环的联结位置(2-或3-位)等特点,可将该类化合物分成多种结构类型,其基本的母体结构见表12-1。天然黄酮类化合物多为这些母体结构的衍生物,其常见的取代基有—OH、—OCH_3、—OCH_2O—及异戊烯基、咖啡酰基等。

色原酮　　2-苯基色原酮　　C_6—C_3—C_6

表12-1　黄酮类化合物的母体结构类型

类型	母体结构	类型	母体结构
黄酮类 (flavones)		黄烷-3-醇类 (flavan-3-ols)	OH
双氢黄酮类 (flavanones)		黄烷-3,4-二醇类 (flavan-3,4-diols)	OH OH

续表

类型	母体结构	类型	母体结构
黄酮醇类 (flavonols)	OH, O	花色素类 (anthocyanidins)	O^+, OH
双氢黄酮醇类 (flavanonols)	OH, O	𠮿酮类 (xanthones)	O, O
异黄酮类 (isoflavones)	O, O	噢哢类 (aurones)	O, =CH−, O
双氢异黄酮类 (isoflavanones)	O, O	呋喃色原酮类 (furanochromones)	O, O, O
高异黄酮类 (homoisoflavones)	O, O	苯色原酮类 (phenylchromones)	O, O
查尔酮类 (chalcones)	OH, O	双氢查尔酮类 (dihydrochalcones)	OH, O

黄酮苷大多为 O-糖苷,还有 C-糖苷(C-glycoside),此外还有一些别的黄酮结构类型,如由两分子或三分子黄酮类化合物互相聚合而生成的双黄酮类(biflavonoids)、三黄酮类(triflavonoids)和高黄酮类(homoflavonoids)化合物等[4,5]。

二、黄酮类化合物的理化性质[6,7]

黄酮类化合物多为结晶性固体,少数为无定形粉末。

黄酮、黄酮醇及其苷类多为灰黄至黄色;查尔酮为黄至橙黄色;双氢黄酮、双氢黄酮醇无交叉共轭体系,一般不显色,但在紫外灯下有特征的颜色或荧光,氨熏后颜色会发生变化;异黄酮类因共轭很少,显微黄色;花色素所显颜色与 pH 有关,一般显红(pH <7)、紫(pH = 8.5)、蓝(pH >8.5)等颜色。

对于黄酮苷元,分子内含有不对称碳原子的双氢黄酮、双氢黄酮醇、双氢异黄酮及其衍生物等具有旋光性,其余苷元则无旋光性。黄酮苷类因结构中含有糖的分子,故均有旋光性且多为左旋。

黄酮苷元难溶或不溶于水,易溶于甲醇、氯仿等有机溶剂中;黄酮苷类则易溶于水、甲醇等强极性溶剂,难溶或不溶于苯、氯仿等有机溶剂。由于黄酮类化合物多数均含有酚羟基,故显酸性,可溶于碱性水溶液(如碳酸钠水溶液)、碱性有机溶剂(如吡啶、甲酰胺、二甲基甲酰胺);黄酮类化合物的吡喃酮环上的 1-位氧原子,因有未共用电子对,故表现微弱的碱性,可与强酸如浓硫酸、盐酸等成盐,但极不稳定,加水后即分解。

黄酮类化合物可与镁粉(或锌粉)/盐酸、硼氢化钠、三氯化铝、氢氧化钠等试剂

产生特征性的颜色反应,用于黄酮类化合物的鉴别。

三、黄酮类化合物在植物中的分布[7]

黄酮类化合物在植物体内的形成,是由葡萄糖分别经莽草酸途径和乙酸-丙二酸途径生成羟基桂皮酸和三分子乙酸,然后合成查尔酮类再衍变为各类黄酮化合物。查尔酮类与(-)-双氢黄酮类可以互相转化,两者可以衍变为双氢黄酮醇类、异黄酮类、噢哢类、双氢查尔酮类等,其中双氢黄酮醇类可以进一步衍变为黄酮醇类、花色素类、(+)-儿茶素类及(-)-表儿茶素类等,异黄酮类可以进一步衍变为紫檀素类(pterocarpines)和鱼藤酮类(rotenones)等,其生源关系如图12-1所示。

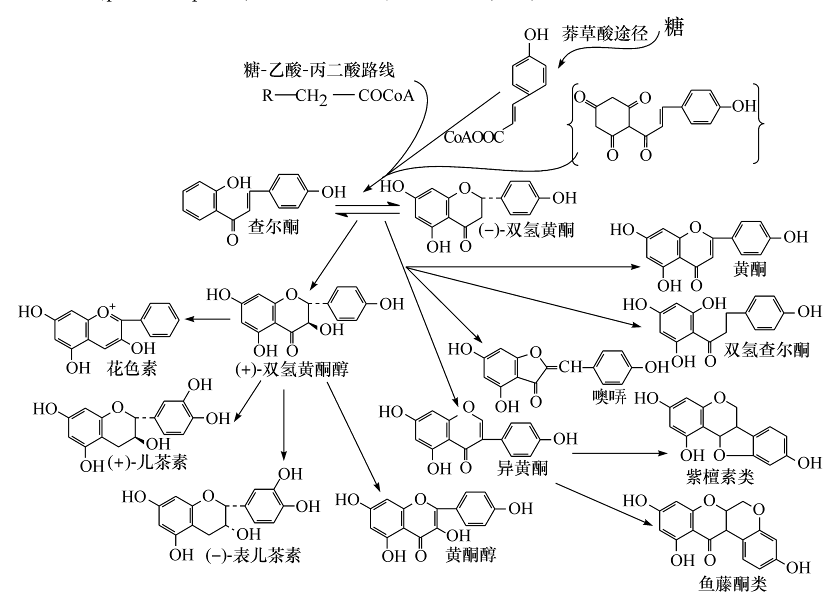


图12-1 黄酮类化合物生源关系

不同类型的黄酮化合物,常常相对集中地分布在某些科属植物中。

(一) 黄酮类及双氢黄酮类

黄酮类广泛分布于被子植物中,以芸香科、菊科、玄参科、唇形科、伞形科、爵床科、苦苣苔科及豆科等植物中存在较多,6-羟基黄酮多存在于草本植物中,8-羟基黄酮则多存在于木本植物中。双氢黄酮类分布较普遍,尤其是在被子植物的蔷薇科、芸香科、菊科、姜科、杜鹃花科、豆科中分布较多。

(二) 黄酮醇类及双氢黄酮醇类

黄酮醇类较广泛地分布于双子叶植物,特别是一些木本植物的花和叶中。该类化合物以山柰酚(kaempferol)和槲皮素(quercetin)最为常见。双氢黄酮醇类存在于裸子植物、单子叶植物姜科的少数植物中,双子叶植物中分布较普遍,在豆科、蔷薇科植物中也较多。

(三) 查尔酮类及双氢查尔酮类

查尔酮类大多分布在菊科、豆科、苦苣苔科植物中,在玄参科、败酱科植物中也有发现。

双氢查尔酮类在植物界分布极少。

(四) 异黄酮类及双氢异黄酮类

异黄酮类主要分布在被子植物中,如豆科植物中(约占 70%),其余分布在鸢尾科、桑科植物中。

中药山豆根(*Sophora tonkinensis* Gagnep.)中所含有的紫檀素(pterocarpin)、三叶豆紫檀苷(trifolirhizin)和山槐素(maackiain)是双氢异黄酮的衍生物,均有抗癌活性,且苷类的活性强于苷元。由于发现大豆异黄酮有防癌作用,葛根素有改善冠心病症状作用,异黄酮的研究正日益受到重视。

(五) 花色素类

花色素类是使植物的花、果、叶、茎等呈现蓝、紫、红等颜色的化学成分,广泛地分布于被子植物中,其中以矢车菊素(cyanidin)、飞燕草素(delphinidin)、天竺葵素(pelargonidin)、锦葵素(malvidin)及其苷类最为常见。

(六) 黄烷醇类

黄烷-3-醇的衍生物称为儿茶素类(catechins),在植物中分布较广,主要存在于含鞣质的木本植物中。

黄烷-3,4-二醇衍生物称为无色花色素类(leucoanthocyanidins),如无色矢车菊素(leucocyanidin)、无色飞燕草素(leucodelphinidin)和无色天竺葵素(leucopelargonidin)等。该类成分在植物界分布也很广,其中在含鞣质的木本植物和蕨类植物中存在较多。该类化合物常因分子聚合而具有鞣质的性质。

(七) 噢哢类

噢哢类定位与其他黄酮类化合物不同。中药中噢哢类比较少见,较多存在于

玄参科、菊科、苦苣苔科以及单子叶植物沙草科中。

(八) 双黄酮类

双黄酮类较集中分布于除松科以外的裸子植物中,如银杏科、松科、杉科;蕨类植物中的卷柏属植物中也有分布。

(九) 其他黄酮类

1. 褐酮类

褐酮又称苯骈色原酮,为一种特殊类型的黄酮类化合物。常存在于龙胆科、藤黄科植物中,在百合科植物中也有分布。

2. 呋喃色原酮类和苯色原酮类

呋喃色原酮类和苯色原酮类在植物界中分布较少,如自凯刺种子和果实中得到的凯林(khellin)等属于呋喃色原酮类化合物。

第二节 黄酮类化合物的提取分离

对黄酮类化合物的提取分离,从其过程来说,可分为两个阶段:第一阶段是提取,主要考虑提取溶剂的选择问题,这和植物所含的黄酮类化合物是苷元还是苷类有关,也和原料是植物的哪一部位有关;第二阶段是分离,目的是将黄酮类化合物与其他非黄酮类成分分开,在需要的时候还要将各黄酮类成分相互分离加以纯化。但在实际操作中,这两个阶段是相互关联,通常不能明确划分。

一、提取

由于黄酮类化合物在溶剂中的溶解性相差很大,没有一种能适合于所有黄酮类成分的提取溶剂,而必须根据目标成分的性质及杂质的类别来选择溶剂,常用的提取方法有以下几种:

(1) 热水提取法

热水提取法常用于各种黄酮苷的提取,提取时常将原料投入沸水以破坏酶的活性,该法还可用于提取黄烷醇、黄烷二醇、原花色素等极性较大的苷元的提取。在提取过程中要考虑加水量、浸泡时间、煎煮时间及次数等[8]。

(2) 乙醇或甲醇提取法

乙醇或甲醇是最常用的黄酮类化合物提取溶剂,高浓度的醇(如 90%~ 95%)适用于提取苷元,60%左右的醇适用于提取苷类。提取的次数一般是 2~ 4 次,可

用渗滤法、回流法和冷浸法[8]。

(3) 系统溶剂提取法

用极性由小到大的溶剂依次提取,如先用石油醚或己烷脱脂,接着用苯提取多甲氧基黄酮或含异戊烯基、甲基的黄酮,再用乙醚、氯仿、乙酸乙酯依次提取出大多数的苷元,然后用丙酮、乙醇、甲醇、甲醇⁻水(1∶1)提取出多羟基黄酮、双黄酮、查尔酮等成分,最后用稀醇、沸水可以提取出苷类,而花色素等成分可用1% HCl提取[8]。

(4) 碱性水或碱性稀醇提取法

由于黄酮类成分大多具有酚羟基,故可用碱性水(如碳酸钠、氢氧化钠、氢氧化钙水溶液)或碱性稀醇(如50%的乙醇)提取,提取液经酸化后可析出黄酮类化合物。但该法提取效果通常不是很好,杂质也较多,而且要注意碱浓度不宜过高,以免加热时强碱会破坏黄酮类化合物的母核。

二、分离

黄酮类化合物的分离包括黄酮类化合物与非黄酮类化合物的分离,以及黄酮类化合物之间的单体分离。常用的分离方法有溶剂萃取法、碱提酸沉法、薄层色谱法、聚酰胺柱层析法、硅胶柱层析法、铅盐法、硼酸络合法、pH梯度萃取法、凝胶柱层析法等,它们在黄酮类化合物的分离纯化中得到了广泛的应用[7,8]。

随着现代科学技术的发展,各种新的提取分离技术不断被应用到中草药的研究和生产领域,一些新的提取分离技术应用于天然产物的研究和生产也取得了很好的效果。

三、新的提取分离技术

(一) 超声提取法

超声提取(ultrasonic extraction, UE)技术是近年来应用到中草药有效成分提取分离中的一种方法,其原理是利用超声波的空化作用加速植物有效成分的浸出,另外超声波的次级效应(如机械振动、乳化、扩散、击碎、化学效应等)也能加速目标成分的扩散释放并充分与溶剂混合,利于提取。

(二) 超滤法

超滤法(ultrafiltration, UF)是一种膜分离技术的代表,通过控制超滤膜孔径大小可以有效去除提取液中的大分子物质,其原理是利用多孔的半透膜,凭借一定的压力,对溶液进行分离,迫使小分子物质通过而大分子物质被截留,从而达到分离、提纯、浓缩的目的。

(三) 大孔吸附树脂柱层析

大孔吸附树脂柱层析(macroporous adsorption resin chromatography, MARC)于20世纪70年代末逐步应用到中草药有效成分的提取分离。其特点是吸附容量大,再生简单,效果可靠,尤其适用于分离纯化黄酮类、皂苷类等成分及其大规模生产[8,9]。

(四) 双水相萃取技术

将两种不同的水溶性聚合物的水溶液混合,当聚合物浓度达到一定值时,体系会自然地分成互不相溶的两相,这就是双水相体系。双水相体系萃取(aqueous two phase extraction, ATPE)分离技术的原理是物质在双水相体系中的选择性分配。不同的物质在特定的体系中有着不同的分配系数,当物质进入双水相体系后,在上相和下相间进行选择性分配,从而达到提取分离的目的。常用的双水相体系有高聚物体系(如PEG/Dextran体系)和高聚物/无机盐体系(如PEG/硫酸盐或磷酸盐体系)[10]。

(五) 超临界流体萃取法

超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)是利用超临界流体对中草药有效成分进行提取分离的新型技术,其原理是利用某种流体在临界点附近一定区域内具有溶解能力强、流动性好、传递性能高的特点来提取分离中草药中的目标成分。

(六) 酶法提取

中药提取物中的杂质大多为淀粉、果胶、蛋白质等,可选用相应的酶利用酶法提取(enzymic extraction, EE)予以分解除去。例如,根中脂溶性、难溶于水或不溶于水的成分多,通过加入淀粉部分水解产物及葡萄糖苷酶或转糖苷酶,使脂溶性、难溶于水或不溶于水的目标成分转移到水溶性糖苷中[11];纤维素酶能够水解葡萄糖苷的β-1,4苷键以破坏植物细胞壁,可用于以纤维素为主的中药材提取。

(七) 高效液相色谱法

采用纸色谱法、柱色谱法及薄层色谱法等分离黄酮类化合物,其分离效果有时并不很理想,采用气相色谱法需要将样品衍生化(如硅烷化),其使用有限制。但采用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)的分离效果则较理想。考虑到HPLC法分离成本相对较高,该法更多是用于黄酮类化合物的定性检测、定量分析或少量样品的制备等。

(八) 胶束薄层色谱法和微乳薄层色谱法

胶束薄层色谱法(micellar thin layer chromatography, MTLC)是以表面活性剂的胶束溶液为流动相,用薄层层析来分离鉴定化合物的一种方法[12]。微乳薄层色谱法(microemulsion thin layer chromatography, ME-TLC)是以微乳液为流动相,用薄层层析来分离鉴定化合物的一种方法。微乳液是由表面活性剂、助表面活性剂、油和水按适当比例自发生成的无色透明、各向同性、低黏度的热力学稳定体系,与胶束体系均属缔合胶体,但在基本特性上有明显差别[13]。微乳体系与胶束体系相比,具有更大的增溶量和超低界面张力,因此具有更高的色谱效率。

(九) 分子烙印技术

分子烙印技术(molecular imprinting technology, MIT)是对特定目标分子(即模板分子)制备具有高度亲和性聚合物材料——分子烙印聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)用于提取分离目标分子的技术。MIP存在与模板分子空间结构互补、官能团相互作用(氢键、离子或范德华力等)的聚合物孔穴,其与模板分子的作用类似于酶和底物的结合,对模板分子具有较强的亲和性及识别能力。谢建春等[14]研究报道,以较容易得到的黄酮类化合物槲皮素作模板制备分子烙印聚合物,从方法上探讨了MIP用于从银杏叶中直接提取黄酮类成分的可行性。

(十) 其他分离技术

其他提取分离技术还有高速逆流色谱(high speed countercurrent chromatography, HSCCC)、分子蒸馏(molecular distillation, MD)技术、微波萃取(microwave extraction, ME)、半仿生提取(semi-bionics extraction, SBE)等新的提取分离技术[15,16],其在中草药化学成分的提取分离方面都有一定的应用前景,但这些技术应用于黄酮类成分提取分离的研究报道较少,还有待于相关学者进一步的深入研究探讨。

第三节　黄酮类化合物的鉴别和结构研究

一、鉴别

常用的黄酮类化合物的定性鉴别方法有理化鉴别、薄层鉴别、HPLC鉴别等,以下做一简单介绍[6,7]。

(一) 理化鉴别

理化鉴别主要是根据化合物的理化性质来确定其属于哪一类黄酮化合物。

1. 颜色、旋光、溶解度

不同类型的黄酮化合物的颜色(如黄酮呈黄色,二氢黄酮几乎无色)、旋光(如黄酮无旋光,二氢黄酮有旋光)、溶解度(如黄酮苷元难溶于水,黄酮苷则常可溶于水)等有所差异,可以根据此性质初步地判断化合物的类型,第一节中“黄酮类化合物的理化性质”已有论述。

2. 显色反应

盐酸-镁粉反应:样品的乙醇或甲醇溶液加少量镁粉振摇,再滴几滴浓盐酸,1~ 2min即可显出颜色(必要时可水浴加热)。黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类及二氢黄酮醇类为正反应,显红色至紫红色,个别显蓝色或绿色(如 7,3′,4′-三羟基黄酮),分子中特别是 B 环有—OH 或—OCH_3 取代时颜色加深。黄酮类化合物如没有 3-OH 或其被糖苷化,其显色反应不明显。异黄酮、查尔酮、噢哢及儿茶精类为负反应。但某些噢哢、查尔酮及花色素类,因在浓盐酸中也会有颜色变化,因此样品溶液不加镁粉而直接加浓盐酸若产生红色,则表明样品含有花色素类或某些噢哢或查尔酮类。此外,还有钠汞齐还原反应、三氯化铝显色反应、Gibbs 反应、四氢硼钠还原反应、锆盐-枸橼酸反应及氨性氯化锶反应等。

(二) 薄层层析和光谱鉴别

利用纸层析、聚酰胺薄膜层析及硅胶薄层层析等进行层析,根据展开后的 R_f 值、喷显色剂及紫外荧光等来鉴别,或与已知标准品对照层析。

紫外、红外光谱也有鉴别作用,可根据实测数据进行推断,或与标准谱进行比较;HPLC 则可经过与标准品或标准谱进行比较来进行鉴别;其他还有 GC、NMR、MS 等。各种鉴别方法及其结果(特别是 TLC、TLC-Scan、HPLC 及 GC 等)可以互相结合形成黄酮类化合物的指纹图谱(fingerprint spectrum),更有利于黄酮类化合物的快速鉴别。

二、结构研究

对于已知黄酮类化合物,一般可通过化学方法(如制备衍生物、颜色反应等)和波谱解析(如 IR、UV、NMR、MS 等)即可鉴定其结构。如果有已知物的标准品,经过 TLC 对照、混合熔点测定、红外光谱对照等,更容易确定其结构。即使是未知的黄酮类化合物,利用当前的波谱技术(IR、UV、NMR、MS 等)及一些辅助的化学方法,也是很容易鉴定其结构的。对于结构特殊的黄酮类化合物,则可以通过全合成得到佐证。这一方面的研究很多,具体可参考文献[1]的相关章节。

(一) 黄酮类化合物的光谱学特征

随着分离纯化技术的不断发展完善,各种黄酮类成分的研究已经比较系统全面,目前研究的热点是微量、含糖数目较多的黄酮苷类成分等。由于信号较多,许多位置(如端基碳区)会发生重叠,较难明确归属所有碳信号,仅靠碳谱确定糖的数目、种类以及利用苷化位移确定苷键位置和糖的连接顺序等比较困难。近年来,二维核磁共振技术的迅猛发展,为黄酮苷及各类化合物的结构鉴定提供了锐利的武器,如用双量子滤过相敏感相关谱(DQPS-COPY)以及中继相干传递谱(RCT),结合 T_1 值测定、2D-NOE 等核磁共振技术,辅以快原子轰击质谱(FAB-MS),即可简便明确地解决样品量少而含糖数目较多的黄酮苷中糖的连接顺序及连接位置等问题[17]。一些新的核磁共振技术的详细介绍可参考《有机化合物结构鉴定与有机波光谱学》(宁永成. 北京:科学出版社,2000)及一些专业期刊等。

质谱的应用也很重要。在测定黄酮类化合物苷元,特别是样品量很少时,电子电离质谱(EI-MS)是常用的有效方法,仅需 1~ 50μg 样品。20 世纪 80 年代发展起来的快原子轰击质谱(FAB-MS),也是一种固体样品测试技术,苷类成分可形成离子复合物后由其进一步裂解,其碎片类型与 FD-MS 基本相同;同时配备了阴离子捕获器,还可得到相应的阴离子质谱,与阳离子质谱互相补充,大大增加了其信息的来源和可信程度。FD-MS 和 FAB-MS 各有所长,FD-MS 在高质量区提供的信息比较详尽,但不能提供有关苷元部分的碎片信息;FAB-MS 除了给出相对分子质量、糖基碎片信息外,在低质量区还可给出苷元的结构碎片信息,从而弥补了 FD-MS 的不足,目前在实际应用中也大多采用 FAB-MS 测试苷类成分。另外,还可采用电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)和大气压化学电离质谱(atmospheric pressure chemical ionization MS, APCI-MS)。ESI 和 APCI 都是很软的电离方法,易于得到样品的相对分子质量,碎片离子峰很少甚至没有,为了得到进一步的结构信息,需要进行碰撞诱导断裂(collision-induced dissociation, CID),通过对碰撞室(collision cell)中的电压进行调节,可以得到不同断裂程度的质谱信息。此外,采用串联质谱技术(tandem MS 或 MS-MS),结合 CID 等可以得到更简化、更丰富的各种质谱信息。

黄酮类化合物的质谱(MS)裂解规律一般有两个共同断裂方式:断裂方式Ⅰ和断裂方式Ⅱ。

圆二色谱(CD)和旋光谱(ORD)的经验规律可用于推定双氢黄酮类和双氢黄酮醇类 C 环中手性碳的绝对构型。

目前利用单晶 X 射线衍射可以得到数千个独立衍射和可观察数据点,从而可获取化合物分子中各个原子的坐标,确定化合物中各个原子的空间相对位置,最终为确定化合物的分子结构提供直观可靠的立体图形。例如,文献[16]报道利用单

晶 X 射线衍射确定了天葵苷中糖的连接位置和构型。

其他联用技术的发展应用,如 HPLC-NMR、HPLC-MS、LC-MS-MS 及 GC-MS 等,为黄酮类化合物的结构鉴定提供了很大的便利。

综上所述,近年来各种结构鉴定技术日益发展完善,为黄酮类化合物的结构解析提供了强有力的手段与方法,有助于阐明各种黄酮类成分的结构。

(二) 黄酮苷元的结构研究

已知黄酮类化合物(包括黄酮苷元和黄酮苷)的鉴定,一般通过衍生物制备和谱学解析即可完成;若有已知物的标准品,经过混合熔点测定、红外光谱对照等,可使鉴定更有说服力。未知物的结构研究,在衍生物制备、谱学解析初步推定结构后,可采用谱学的特殊测定或化学降解及化学转化对推定结构加以验证;个别结构特殊的化合物还可以通过全合成证明。具体介绍如下。

1. 衍生物的制备

黄酮类化合物常用的衍生物为乙酰化物和甲基化物。制备这些衍生物时,一方面是与文献中已知化合物的理化数据(谱学数据)对照,借此加以比较鉴定;另一方面是将这些衍生物与原化合物的谱学数据进行比较而推定结构。

(1) 乙酰化物的制备

乙酐或乙酰氯在催化剂(如吡啶、乙酸钠、浓硫酸、4-二甲胺基吡啶及对-甲基苯磺酸等)作用下可使羟基乙酰化,所用试剂都必须无水。其中以乙酐/吡啶法最为常用。

某些黄酮苷类及某些遇碱不稳定或在碱中容易异构化的黄酮类化合物,以碱催化时反应产物复杂或不容易乙酰化,可用微量的浓硫酸或无水的对甲基苯磺酸催化。

(2) 甲基化物的制备

重氮甲烷能使酚羟基甲基化,该法的反应产物便于处理且产量高,如果 5-OH 因生成氢键不易甲基化,可用硫酸二甲酯或其他方法甲基化。硫酸二甲酯可使黄酮化合物中的羟基全部甲基化。

另外,还有一个快速、简便的全甲基化方法,适用于各种苷类及糖类的全甲基化,产量很高,且便于甲基化物的气相层析分离、鉴定。其操作方法为:将 4~5mg 糖或苷类溶于 0.3~0.5mL 的 DMSO 中,在室温加入磨细的氢氧化钠粉末 20mg,搅拌 6min,再加入 0.1mL 碘甲烷,搅拌 6min 反应即完成,然后加水和氯仿各 1mL,取氯仿层水洗后干燥,蒸干,进行层析处理或以适当溶剂结晶即可。在实际操作中,由于在反应中加入过量的碱,某些易水解的酰基会脱落,继而将新生成的羟基甲基化,在结构测定时需要加以考虑。

2. 光谱学的特殊测定

因黄酮苷元结构一般比较简单,经各种常规谱的测定、衍生物制备及其与衍生物的各种谱的比较,即可推定其结构。只有结构较特殊或出于进一步证明结构的目的才需要光谱学的特殊测定。

(1) 羟基位置诊断试剂的紫外光谱测定

常用的羟基位置诊断试剂有甲醇钠、乙酸钠、三氯化铝、乙酸钠/硼酸及三氯化铝/盐酸等。通过这些试剂加入前后紫外光谱的比较而得出的位移值可判断羟基的位置。具体实验方法及各诊断试剂引起紫外光谱改变与各类黄酮羟基位置的关系,可参考文献[1,6]等。这种测定需要样品量少(微克级),因方法简便而广泛应用。

(2) ^{1}H-NMR-NOE 和溶剂位移测定等

应用甲氧基质子与邻位芳香质子产生 NOE 增益可推定黄酮甲氧基位置;氘代苯对黄酮中不同位置的甲氧基所产生的^{1}H-NMR 诱导位移也有经验规律报道,并已用于结构测定。这两个方法是测定甲氧基的重要方法,尤其是前者,可靠而简便,且可用于阐明立体化学。如果黄酮母核上有骈环,可应用质子间的 NOE 关系推定骈环的位置及阐明质子的立体化学。另外,采用 HMBC 技术测定,通过甲氧基与相连的碳有相关的信号可以容易地确定其位置,而 NOESY 技术用于立体化学研究也很方便。

3. 化学降解

化学降解是将复杂结构的化合物用化学方法分解成结构较简单的化合物,然后通过对降解物的结构研究而阐明原来的复杂结构。在光谱学高度发展的今天,其在结构研究中已不常用,但对结构奇特的化合物来说,用化学降解的方法进行结构研究仍是一种重要途径。常用的方法有氧化、还原及碱分解法等。

4. 研究实例

【例 12-1】 补骨脂甲素(corylifolin)和补骨脂乙素(corylifolinin)的结构研究

补骨脂甲素、补骨脂乙素是从中药补骨脂(*Psoralea corylifolia* L.)中分得的两个黄酮类化合物,其中补骨脂乙素有增加冠状动脉流量和抑制 Hela 细胞的作用。

(1) 补骨脂甲素

补骨脂甲素的分子式 $C_{20}H_{20}O_4$,熔点 211~212℃,$[\alpha]_D^{20}$ 为 -22.2°(EtOH);紫外吸收光谱(EtOH):λ_{max}(lgε)(nm)为 219(4.49)、237(4.45)、280(4.24)、323(3.94);镁粉/盐酸反应呈蓝紫色;补骨脂甲素在 10% 乙醇溶液中室温放置可生成

查尔酮;从其紫外光谱带Ⅱ、带Ⅰ的位置及强度,以及具有光学活性和遇碱开环生成查尔酮等特性,可推定其为双氢黄酮类化合物。

其分子式除构成一般双氢黄酮类的片段外,尚余 C_5H_9 残基;其在 Pd/C 催化下氢化得二氢化物,臭氧化生成丙酮,表明该残基为γ,γ-二甲基烯丙基;其以氢氧化钾熔融得间苯二酚、对羟基苯甲酸和带有 C_5H_9 残基的苯乙酮衍生物,揭示 B 环具有 4′-OH 和γ,γ-二甲基烯丙基取代在 A 环上;带有 C_5H_9 残基的苯乙酮衍生物的 ^{1}H-NMR 在 δ7.27ppm 和 δ6.22ppm 各有 1 个单峰芳香质子,表明芳香质子处于对位,因而该化合物为 2,4-二羟基-5-(γ,γ-二甲基烯丙基)-苯乙酮,该推定经合成得到证明。因此补骨脂甲素的结构为 7,4′-二羟基-6-(γ,γ-二甲基烯丙基)-双氢黄酮。

10%KOH/EtOH 室温

固体KOH 加热熔融

补骨脂甲素

C-2 的绝对构型由补骨脂甲素与绝对构型已知物(2*S*)-甘草苷元(liquiritigenin)的旋光谱比较而推定,两者的旋光谱曲线类似,在 325~375nm 区是正 Cotton 效应,因此补骨脂甲素的构型应与甘草苷元相同,为 2*S* 型。

(2*S*)-甘草苷元　　补骨脂甲素

(2) 补骨脂乙素

补骨脂乙素的分子式为 $C_{20}H_{20}O_4$,熔点 166~167℃,无光学活性;紫外吸收光谱 λ_{max}(lgε)(EtOH)为 230nm(sh, 4.16)、371nm(4.16),呈现典型的查尔酮紫外光谱特征;其在 5% HCl 乙醇溶液中闭环生成消旋双氢黄酮,也证明其为查尔酮化合物;经臭氧化和氢化分别得到丙酮和二氢化物;固体碱熔融得间苯二酚和对羟基苯甲酸;溶液碱分解,除得到对羟基苯甲酸外,还得到具有 C_5H_9 取代基的苯乙酮衍生物,该衍生物的 ^{1}H-NMR 在 δ7.45ppm 和 δ6.37ppm 显示 1 对 AB 型质子峰($J=9$),表明两个芳香质子处于邻位,应为 2,4-二羟基-3-(γ,γ-二甲基烯丙基)-苯乙酮,则补骨脂乙素的结构为 2′,4′,4-三羟基-3′-(γ,γ-二甲基烯丙基)-查尔酮。

补骨脂乙素

5%HCl EtOH，室温

NaOH(固体) 熔融

50%KOH 回流

(3) 补骨脂乙素及其降解产物的合成

2,4-二羟基苯乙酮的单钠盐悬浮于无水苯中与1-溴代异戊二烯加热回流19h,得到补骨脂甲素和补骨脂乙素的碱分解产物,即具有 C_5H_9 取代基的苯乙酮衍生物。将其分离后,以补骨脂乙素的苯乙酮衍生物与对-羟基苯甲醛在强碱条件下缩合,可得补骨脂乙素及其闭环物,进一步证明了补骨脂乙素的结构。

1.7%NaOH 丙酮

无水苯回流

KOH

(三) 黄酮苷类的结构研究

在自然界中黄酮类化合物大量地以苷类的形式存在,多数黄酮苷元通过氧原子与糖连接而生成苷,称为 *O*-苷(黄芩苷);部分黄酮苷元以碳与糖相连而构成苷,称为 *C*-苷(葛根素)。如果以苷元所连接的糖的数量来区分,又可分为单糖苷(如黄芩苷,baicalin;葛根素,puerarin)、双糖苷(如橙皮苷, hesperidin)、三糖苷(如洋槐苷,robinin)等。由于黄酮苷类中至少含有1分子糖,电子轰击(EI)质谱很难获得其分子离子峰,可改用场解吸(FD)质谱或快原子轰击(FAB)质谱。如果仍有困难,可将其全甲基化使分子的热稳定性和挥发性增加后再测定。从 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR谱中,糖的质子在 δ3.0~6.0ppm 区域内,碳在 δ60~105ppm 区域内有

吸收峰,可直接由苷的^{1}H NMR和^{13}C NMR谱中糖质子和碳的数目得知苷分子由几个糖组成,进一步解析还能获得糖的结构及苷元连接方式的信息。

黄酮苷类的结构测定,包括黄酮苷元的结构测定、糖的结构测定以及糖与苷元连接结构的测定。苷元的结构测定上面已有所叙述;黄酮苷类中的绝大多数糖都是已知的,且糖的种类也不多,糖的结构测定通常是对已知糖进行鉴定。因此,黄酮苷类的结构测定主要是研究糖与苷元的连接结构,即对苷化位置和苷的构型进行阐明。

1. 苷的水解

黄酮苷类在一般水解条件下不会水解,通常把不能被酸水解作为鉴别碳苷的证据之一,而氧苷可以被酸和某些专一性酶水解,适当地控制水解条件可达到完全水解或部分水解的目的。黄酮苷类的结构对水解难易(即水解速率)有影响;糖的种类和连接在黄酮母核上的位置会造成水解速率的差异。酶水解是一种温和、专一、简便的方法。随着各种酶的商品化,其应用将更加广泛。

2. 糖的鉴定

黄酮苷类中的糖绝大多数是已知的,可将酸水解液的水溶部分适当处理(如聚酰胺层析)后或直接进行纸层析鉴定,同时以已知糖的标准品对照。

气相层析鉴定也很方便,可将酸水解液的水溶部分减压抽干后制备三甲基硅醚衍生物(5mg样品溶于0.5mL无水吡啶中,加0.2mL六甲基二硅氨烷和0.1mL三甲氯硅烷,密封5min,减压抽干即可),或制备全甲基化衍生物,然后进行气相层析鉴定,并以已知糖的相应衍生物对照。

近年来,由于^{1}H-NMR和^{13}C-NMR的发展应用,可不经水解直接从核磁共振谱的糖质子区(δ3.0~6.0ppm)和糖碳区(δ60~105ppm)中观察糖质子与糖碳的数目而推定糖的多少。该法简单可靠,脱氧糖的脱氧碳及其质子在较高场,如鼠李糖的甲基在δ<1.5ppm区有一个双峰,在δ<20ppm区有一个甲基碳信号,可利用这些特征直接推定糖的性质及数目。

3. 苷化位置的测定

黄酮苷类的^{1}H-NMR和^{13}C-NMR可以直接测定苷化位置。利用苷化位置的不同所引起的糖端基质子(H-1″)化学位移差异,可获知苷化位置的信息。

在^{13}C-NMR中,苷元的苷化碳一般向高场位移2ppm左右(与苷元比较,下同)。但不同的苷化位置使邻、对位碳的位移有明显差异,黄酮醇的3-*O*-苷使C-2信号向低场位移~9ppm而成为3-*O*-苷的明显特征。黄酮的5-*O*-苷使5-OH与羰基的缔合破坏,邻、对位碳也明显向低场位移3.0~4.5ppm,C环的C-2、C-4分别

向高场位移~ 3.0ppm 和~ 6.0ppm,而 C–3 向低场位移~ 2.5ppm;7–*O*–苷和 4′–*O*–苷则分别使邻位碳和对位碳向低场位移 0.5~ 1.0ppm 和 1.5~ 1.8ppm。

4. 端基碳的构型

端基碳有α–和β–两种构型,多数葡萄糖苷、半乳糖苷、葡萄糖醛酸苷和木糖苷为β–构型;多数阿拉伯糖苷和鼠李糖苷则为α–构型。

以^{1}H–NMR 和^{13}C–NMR 测定端基碳构型极为方便,可以直接推定端基碳构型,比经典方法简单而可靠。

5. *C*–苷的结构测定

近几年来,由于分离技术的进步,从天然界分离得到的黄酮碳苷数量猛增,除了常见的黄酮–*C*–苷和黄酮醇–*C*–苷外,查尔酮–*C*–苷、双氢黄酮–*C*–苷和双氢黄酮醇–*C*–苷等也相继发现。

^{13}C–NMR 是判别 *C*–苷和 *O*–苷的简捷而可靠的手段。该法不必将糖从苷元上断下来而可直接测定 *C*–苷的结构,*C*–苷的端基碳(C–1″)在 δ71~ 78ppm 区域内,除脱氧糖的脱氧碳在高场区外,糖碳峰出现在 δ60~ 82ppm 之间;同时苷元的苷化碳由 d 峰变为 s 峰,并向低场位移 6~ 11ppm。*O*–苷的端基碳(C–1″)在较低场 δ95~ 105ppm 区域内,与芳香碳重叠;苷元的苷化碳只有较小的位移(± 2ppm),且均为 s 峰。

6–与 8–*C*–黄酮苷也可以用 CD 谱区别,此外全甲基化或全氘甲基化 *C*–苷的质谱对 *C*–苷的结构研究也很有帮助。

第四节　黄酮类化合物的药理研究

黄酮类化合物分布广泛,具有多种生物活性,一直以来都得到国内外学者的重视,报道了很多有关黄酮类化合物的药理研究情况,下面对此做一概述。

(一) 心血管系统活性[6, 18]

不少治疗冠心病有效的中成药均含黄酮类化合物,研究发现芦丁(rutin)、槲皮素(quercetin)、葛根素、人工合成的立可定(recordil)等均具有明显的扩冠作用;槲皮素、芦丁、金丝桃苷、葛根素、灯盏花素(breviscapine)、葛根总黄酮、银杏叶总黄酮对缺血性脑损伤有保护作用;金丝桃苷(hyperin)、水飞蓟素(silybin)、木犀草素(luteolin)、沙棘总黄酮对心肌缺血损伤有保护作用;银杏叶总黄酮、葛根素、大豆苷元(daidzein)等能显著降低心脑血管阻力和心肌耗氧量及乳酸的生成,对心肌缺氧损伤有明显保护作用。另外,还有沙棘总黄酮、葛根素、苦参总黄酮、甘草黄酮

(主要为甘草素和异甘草素)具有抗心律失常作用。

(二) 抗菌及抗病毒活性[6, 18]

木犀草素、黄芩苷、黄芩素等均有一定程度的抗菌作用;槲皮素、双氢槲皮素、桑色素(morin)、山柰酚等具有抗病毒作用。从菊花、獐牙菜(*Swertia bimaculata*)中分离得到的黄酮单体化合物对 HIV 病毒有较强的抑制作用,大豆苷元、染料木素(genistein)、鸡豆黄素 A(biochanin A)对 HIV 病毒也有一定抑制作用。

(三) 抗肿瘤活性[19, 20]

黄酮类化合物的抗肿瘤机制多种多样,如槲皮素的抗肿瘤活性与其抗氧化作用、抑制相关酶的活性、降低肿瘤细胞的耐药性、诱导肿瘤细胞凋亡及雌激素样作用等有关;水飞蓟素的抗肿瘤活性与其抗氧化作用、抑制相关酶的活性、诱导细胞周期阻滞等有关。显然,黄酮类化合物有效多样的抗肿瘤活性预示其在肿瘤防治方面具有广阔的应用前景。

(四) 抗氧化自由基活性[18]

大多数黄酮类化合物均有较强的抗氧化自由基的作用,而黄酮类化合物的一些药理活性也往往同其抗氧化自由基相关。

(五) 抗炎、镇痛活性[6, 18]

芦丁、羟乙基芦丁、双氢槲皮素等对角叉菜胶、5-HT 及 PGE 诱发的大鼠足爪水肿、甲醛引起的关节炎及棉球肉芽肿等均有明显抑制作用。金荞麦中的双聚原矢车菊苷元有抗炎、解热、祛痰等作用。金丝桃苷、芦丁及槲皮素等具有良好的镇痛作用。银杏叶总黄酮(TFG)也有良好的镇痛作用。

(六) 保肝活性[6, 18]

有资料报道水飞蓟素可显著抑制肝匀浆中 MDA 的产生,临床研究表明水飞蓟素对中毒性肝损害、急慢性肝炎、肝硬化等有良好的治疗作用。淫羊藿黄酮、黄芩素、黄芩苷能抑制肝组织脂质过氧化、提高小鼠肝脏 SOD 活性,减少肝组织脂褐素形成,提示对肝脏有保护作用。田基黄总黄酮有降酶、改善肝功能的作用;黄芩苷对阿霉素引起的肝脂质过氧化有保护作用;甘草黄酮可保护乙醇所致肝细胞超微结构的损伤等。

此外,大量研究表明黄酮类化合物还具有降压、降血脂、抗衰老、提高机体免疫力、泻下、镇咳、祛痰、解痉及抗变态等药理活性,说明黄酮类化合物的活性谱非常之广,而且该类化合物种类繁多,在植物中广泛分布,毒性又比较低,因此黄酮类化

合物是新药开发研究中一个非常重要的资源,具有很广阔的开发应用前景。

第五节　黄酮类化合物的含量测定及其制剂

一、黄酮类化合物的含量测定

含量测定在中药材的品质鉴定、制剂工艺的评价及中药制剂的质控等方面有非常重要的意义,目前常采用以下方法测定黄酮的含量。

(一) 紫外分光光度法

紫外分光光度法(UV 法)测定黄酮的含量被一些药典所采用,其原理是黄酮类化合物骨架的紫外光谱有两个主要吸收峰,即带Ⅰ(300~400nm)和带Ⅱ(240~280nm),有时可加入诊断试剂如 $AlCl_3$ 作为显色剂,黄酮类化合物与金属离子形成络合物后一般为黄色或橙色。但 UV 法不专属,仅可大约估计总黄酮含量,不能细致地定性定量测定单个黄酮类成分。不过其操作简单方便,仍是一种简易可行的测定方法,也可用于企业生产环节中初步的质量控制。

(二) 薄层扫描法

薄层扫描法(TLC-Scan 法)曾是黄酮常用的含量测定方法,如荧光薄层扫描法测定葛根中的葛根素含量[21]、双波长薄层扫描法测定淫羊藿苷的含量[22]、薄层扫描法测定红曲及其制剂血脂康中大豆苷元的含量[23],其简便易行,重现性好。但与 HPLC 相比,操作还是比较繁琐,而且准确性也较差,目前其主导地位已逐渐被 HPLC 所取代。

(三) 高效液相色谱法

20 世纪 70 年代后期,高效液相色谱法(HPLC 法)逐步广泛应用于各类化学成分的含量测定。以 HPLC 定量,最低可检测到纳克级或皮克级的样品。在定量检测植物中的黄酮类成分时,常用的提取方法有甲醇回流提取、氯仿振摇浸提、丙酮回流提取、流动相提取及超声提取等。目前关于 HPLC 法测定黄酮类化合物含量的研究报道很多,HPLC 为药材的品质评定、药材的采收时间、提取工艺的筛选、制剂的质量控制等提供了简便、快速、高效的测试方法。

(1) HPLC 法测定不同产地葛根中葛根素的含量[24]

用高效液相色谱法分别测定安徽、山东、山西、湖北野葛(*Pueraria lobata* Wild Ohwi)及广西粉葛(*Puerariae thomsonii* Benth.)中葛根素的含量,结果表明山东葛根中的葛根素含量最高,其品质最优。

(2) HPLC 法测定不同采收期黄芩中的黄芩苷含量[25]

用高效液相色谱法分别测试一年中每个月的第 15 日采收的黄芩(华南植物园)中的黄芩苷含量,结果表明春、秋两季采收的黄芩中黄芩苷的含量最高,与春、秋两季采挖的传统经验相一致,其中以秋季采挖最佳。

(3) 不同方法精制淫羊藿水提液中淫羊藿苷的含量测定[26]

用高效液相色谱测试四种精制方法所得浸膏中的淫羊藿苷(icariside)含量,结果表明醇沉法所得浸膏中淫羊藿苷含量最高,其余方法均有所不及,故醇沉法仍是首选的精制工艺。

(4) 三种银杏制剂黄酮苷元的含量测定[27]

用高效液相色谱测试两种国内银杏片剂和一种进口银杏片剂中黄酮苷元的含量,结果表明国内产品中黄酮苷元的含量与进口产品相差无几。

(5) 国外的研究报道

Merken 等[28] 整理了一篇有关采用 HPLC 检测黄酮类成分的综述,全面系统地介绍了色谱条件的选择、检测手段、样品制备及不同类型黄酮的 HPLC 行为等内容,提供了丰富的信息,可供参考。

综上所述,HPLC 法技术成熟,灵敏度高、重现性好,操作简单、快速高效,已逐渐成为含量测定的首选方法,为中药材及其制剂中黄酮类化合物的检测提供了很好的手段。

(四) 毛细管电泳法

与 UV 法、TLC 法相比,毛细管电泳法具有分析周期短、消耗溶剂少、费用低、抗污染能力强等优点,适宜于一些黄酮类成分的快速定量分析。例如,采用高效毛细管电泳法测定葛根及其制剂正心泰胶囊中葛根素的含量[29]。其他如采用胶束电动毛细管色谱法测定银杏黄酮;采用毛细管区带电泳-电化学测定黄芩及其制剂中黄芩素和黄芩苷含量等[30]。

其他含量测定方法如气相色谱法、高速逆流色谱法、电喷雾 HPLC-MS 法、GC-MS、固相微萃取法及超临界萃取-色谱法等也有报道,但应用还不很普遍,有待进一步研究探讨。

二、黄酮类化合物的制剂

鉴于黄酮类化合物多种多样的药理活性,将黄酮类成分制成合适的剂型以供药用也是黄酮类化合物的一个重要研究方向。20 世纪 90 年代以来,随着制剂工艺的改进和生产技术的提高,银杏制剂已有浸膏剂、片剂、胶囊剂、软胶囊、颗粒剂、口服液、注射剂等多种剂型问世,广泛用于治疗心脑血管疾病,肝、肾、肺部疾患,精神病及糖尿病等,效果良好[31]。葛根大豆苷元毒性很低,适合长期用药,可用于改

善和消除高血压、冠心病患者的头晕、项强等症状,有温和的降压作用,而且对突发性耳聋及骨质疏松症也有良好的疗效,很有开发价值;但葛根大豆苷元属异黄酮结构,水溶性差,脂溶性也不理想,故生物利用度差;将葛根大豆苷元与聚维酮(PVP)以一定比例制成固体分散片,可以大大提高其体内生物利用度,疗效更佳[32]。淫羊藿苷是中药淫羊藿中的主要有效成分,具有扩张冠脉和外周血管、改善机体各部血液循环等作用,将其与乳剂型软膏基质 HP-β-CD 制成皮肤外用软膏,释药速度加快,可以增强药物疗效,减少不良反应等[33]。壮骨肾宝胶囊用于对类固醇性及长期应用羟基脲或肾上腺皮质激素乙酸泼尼松所致的骨质疏松症具有显著的防治作用[34]。

现代科学技术的发展,为中药制剂的发展提供了良好的条件,出现了更好的提取分离纯化工艺,如絮凝沉淀法、超临界萃取技术、超声波提取、膜分离技术、超滤技术、微波萃取、半仿生提取法以及酶化学技术等,客观上可以更好地除去杂质以提高制剂的质量,从而达到减少剂量、提高疗效的目的。新型辅料的研究发展,将中药制剂的发展推向更新的阶段,如聚维酮及聚乙二醇(PEG)是西药固体分散剂良好的载体,在中药制剂中也发挥着同样的作用,促进了中药滴丸剂的发展。丙烯酸树脂Ⅱ号用于青蒿素缓释颗粒的制备,具有较好的缓释效果,当速释部分释放量减少时,缓释部分的释放量逐渐增加,总体上保证了血药浓度的恒定;壳聚糖(chitosans)有类同于葡聚糖胺的结构特性,作为药物载体有很大的优越性,以壳聚糖为原料的药剂辅料有多种功能,如助悬剂、黏合剂、缓释剂、控释剂、微球载体和药用膜等功能;将其用于中药缓释微球揭开了研制中药缓释制剂新的一页[35,36]。其他如脂质体、毫微型胶囊、微球与磁性微球、微囊、固体分散体及饱和技术等应用于中药制剂也有很好的前景[37,38],将其用于黄酮类成分的制剂也有待于进一步的深入研究。

随着现代医疗保健的要求日益提高,药物制剂正向着“三效”(高效、长效、速效)和“三小”(剂量小、毒性小、副作用小)的方向发展,理想的中药制剂应具有稳定明确的成分指标以及可重复的药理和临床效用数据,而当前大多数的中药制剂离这个目标仍有一定的差距,黄酮类成分的制剂研究应该高屋建瓴,运用先进的制剂技术和材料,研制出符合现代医疗所需的中药制剂,以更好地促进黄酮类化合物的开发与应用。

三、结语

综上所述,黄酮类化合物分布广泛,种类繁多,药理活性多种多样,已有的产品也显示了黄酮类化合物的产业化前景。结合各种新的分离手段、制剂方法、分析技术以及现代生物技术、信息技术等,更深入地研究黄酮类化学成分,有望开发出抗肿瘤、抗衰老、治疗心血管疾病等具有广阔市场前景的新药,为人类防病治病做出

应有贡献。

参 考 文 献

[1] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室. 黄酮体化合物鉴定手册. 北京:科学出版社, 1981
[2] Harborne J B et al. The Flavonoids: Advances in Research. London, New York: Chapman & Hall, 1982
[3] Franks L et al. Flavonoids and Bioflavonoids: Studies in Organic Chemistry. New York: Elsevier, 1985
[4] Harborne J B et al. The Flavonoids: Advances in Research Since. London, New York: Chapman & Hall, 1986; 1994
[5] Agrawal P K et al. Carbon-13 of Flavonoids. New York, Oxford: Elsevier. 1989
[6] 徐任生. 天然产物化学(第二版), 北京:科学出版社, 2004, 526~571
[7] 肖崇厚. 中药化学. 上海:上海科学技术出版社, 1994, 265~274, 274~279, 265, 331
[8] 李苑, 张敏. 广东药学, 1999, 9(2):4~6
[9] 马振山. 中成药, 1997, 19(12):40
[10] Mishima K et al. 日本溶剂萃取论文报告会. Ⅱ. 富冈, 日本:1995
[11] 徐莲英, 陶建生, 冯怡等. 中成药, 2000, 22(1):6~19
[12] 林辉概, 戈早川, 李志良等. 药学学报, 1991, 26(6):471~474
[13] 康纯, 闻莉毓, 丁仲伯. 药物分析杂志, 2000, 202:121~124
[14] 谢建春, 骆宏鹏, 朱丽荔等. 物理化学学报, 2001, 17(7):582~585
[15] 冯年平, 范广平, 韩朝阳. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(10):15
[16] 渠桂荣, 郭海明. 中草药, 2000, 31(4):310
[17] 崔承彬, 陈英杰, 姚新生等. 沈阳药学院学报, 1991, 8(1): 36~38
[18] 黄河胜, 马传庚, 陈志武. 中国中药杂志, 2000, 25(10):589~592
[19] 施明. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(2):96~99
[20] 韩冰, 杨峻山. 中草药, 2000, 31(11):873
[21] 尚晓虹, 董川, 冯育林等. 分析化学, 2001, 29(1):115
[22] 郁爱萍, 芦金清, 余南才. 湖北中医杂志, 2001, 23(1):49
[23] 徐艳春, 魏璐雪, 何大林等. 中国中药杂志, 2001, 26(1):33~34
[24] 肖学凤, 高岚. 中草药, 2001, 32(3):220
[25] 徐纪文, 罗素芗. 广东药学院学报, 2000, 16(4):314~315
[26] 赵小妹, 聂其霞, 张保献等. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(6):3~5
[27] 黎曙霞, 唐蕾, 伍杰雄等. 广东药学, 2001, 11(1):20~21
[28] Merken H M, Beecher G R. J Agric Food Chem, 2000, 48(3): 577~599
[29] 李红兵, 孙立华, 胡永明等. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(3):213~214
[30] 陈刚, 李利军, 叶建农. 分析测试学报, 2001, 20(1):27~29
[31] 郭海平, 李惠珍, 管钧. 天津药学, 2001, 13(3):62~64

[32] 黄绮红, 胡容融. 广东药学院学报, 2001, 17(2):87~ 88
[33] 楼志华, 刘艳丽. 中成药, 2001, 23(5):321~ 323
[34] 刘江琴, 梁统, 庄海旗等. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(3):192~ 194
[35] 褚佩英, 章叶静, 李健等. 中草药, 2001, 32(3):273~ 275
[36] 张志荣, 黄园. 中草药, 2000, 31(增刊):1~ 5
[37] 王雪莉, 朱春燕, 杨世林. 中草药, 2001, 32(2):176~ 178
[38] 张景勍, 张志荣. 中草药, 2000, 31(增刊):23~ 25

第十三章　蒽醌类化合物

第一节　概　　述

蒽醌类化合物是蒽醌(anthraquinone)的衍生物[1]。蒽醌(9,10-蒽二酮)的1-、4-、5-、8-位称α-位,2-、3-、6-、7-位称β-位,9-、10-位称 *meso*-位。蒽醌类化合物的取代基有甲基、羟甲基、羧基、醛基等含碳基团,也有羟基、甲氧基等取代基。绝大多数的天然蒽醌类化合物含羟基。

蒽醌

植物体内的蒽醌类化合物可呈游离形式或糖苷形式。蒽醌苷中的糖多为葡萄糖,部分为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖等。

绝大多数天然蒽醌类化合物存在于高等植物、霉菌和地衣中。高等植物中,茜草科植物中的蒽醌类化合物最多,芸香科、鼠李科、豆科山扁豆属(*Cassia*)、蓼科大黄属(*Rheum*)和酸模属(*Rumex*)、紫葳科、马鞭草科、玄参科毛地黄属(*Digitalis*)及百合科植物中蒽醌类化合物也较多。霉菌中以曲霉属(*Aspergillus*)及青霉属(*Penicillium*)中蒽醌类化合物较多。

一、结构类型

(一) 一取代蒽醌

一取代蒽醌的取代基多在β-位。顶生醌(tectoquinone)来源于马鞭草科的柚木(*Tectona grandis* L. fil)、大戟科的 *Acatypha india*、茜草科的羊角藤(*Morinda umbellata* L.)等植物。顶生醌是少数无羟基取代的蒽醌之一,顶生醌具有驱赶白蚁和其他昆虫的作用,柚木、榆木由于存在顶生醌,所以可以长期保存。2-羟甲基蒽醌存在于茜草科植物百眼藤(*Morinda parvifolia*)根中,体内实验可抗白血病。

顶生醌　R=H
2-羟甲基蒽醌　R=OH

(二) 二取代蒽醌

二取代蒽醌种类不多,代表化合物是茜草素(alizarin)。多数二取代蒽醌的取代基在同一个环上。

茜草素　R=H
茜草素-2-甲醚　R=CH_3

茜草素,熔点290℃,是芸香科茜草(*Rubia cordifolia* L.)、染料茜草(*R. tinctorum*)、羊角藤、海巴戟(*Morinda citrifolia*)等植物的代表化合物,并以葡萄糖苷形式存在于 *Libertia coerulescens* 中。茜草素-2-甲醚(alizarin-2-methyl ether)与茜草素共存于上述植物中。西洋茜草曾在西欧广泛种植,当时其根是茜草素的主要来源。

(三) 三取代蒽醌

自然界存在较多的三取代蒽醌。三取代蒽醌中大黄素型和茜草素型蒽醌衍生物比较重要。

1. 大黄素型蒽醌

大黄素型蒽醌衍生物的羟基分布在两侧的环上,此类蒽醌多数呈黄色。中药大黄中的主要蒽醌衍生物属大黄素型。

大黄酚(chrysophanol,chrysophanic acid),熔点196℃,相当广泛地存在于高等植物和低等植物中。在掌叶大黄(*R. palmatum* L.)中,大黄酚以1-*O*-β-葡萄糖苷即大黄酚苷(pulmatin)、8-*O*-β-葡萄糖苷(chrysophanein)和其双葡萄糖苷的形式存在。

大黄酚　R=CH_3
芦荟大黄素　R=CH_2OH
大黄酸　R=COOH

芦荟大黄素(aloe-emodin),熔点 223～224℃,存在于蓼科植物掌叶大黄根茎、药用大黄(*Rheum officinale*)根茎、巴天酸模(*Rumex patientia*)根、齿果酸模(*R. dentatus*)叶;豆科植物山扁豆(*Cassia mimosoides*)根、决明(*C. obtusifolia*)[2] 和望江南(*C. occidentalis*)种子,鼠李科鼠李(*Rhamnus davurica*)果实及芦荟属植物中。芦荟大黄素是大黄抗菌有效成分。芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷存在于掌叶大黄根茎中,是大黄泻下的主要成分之一。芦荟致泻的主要成分是芦荟大黄素的葡萄糖碳苷化合物芦荟苷(aloin),熔点 146～148℃。

芦荟苷

自然界中大黄酸(rhein),熔点 321～322℃,常以游离状态和成苷状态共存。大黄酸的二聚体番泻苷(sennoside)存在于大黄及番泻叶(*Cassia angustifolia*)中。番泻苷具有两种异构体:番泻苷 A(sennoside A)和番泻苷 B(sennoside B)。大黄及番泻叶致泻作用是番泻苷 A 在肠内的降解产物所致。

番泻苷A　熔点 200～240℃ (dec.), $[\alpha]_D$为 −147°
番泻苷B　熔点 180～186℃ (dec.), $[\alpha]_D$为 −100°

2. 茜草素型蒽醌

茜草素型蒽醌衍生物羟基分布在一侧环上，化合物多数为橙红色。中药茜草中的主要蒽醌衍生物多属此型。

紫红素（purpurin）熔点 263℃，是此类蒽醌的典型化合物。紫红素存在于茜草科西洋茜草、茜草以及猪殃殃属（*Galium*）植物中。紫红素是茜草中所含的茜草素以外的另一种重要色素。

紫红素

（四）四取代蒽醌

四取代蒽醌的代表化合物是大黄素，其苷是中药大黄中主要活性成分。

大黄素　R=OH
大黄素甲醚　$R=OCH_3$

大黄素（emodin），熔点 256～257℃，是最广泛分布的一种天然蒽醌。在高等植物中它主要以糖苷形式存在，在真菌中存在它的二聚体。大黄素-8-*O*-葡萄糖苷存在于蓼科虎杖（*Polygonum cuspidatum*）树皮、窄叶大黄（*Rheum sublanceolatum*）根茎[3]和菊科干崖子橐吾（*Ligularia kanaitizensis*）根茎[4]中。大黄素甲醚（physcion，rheochrysidin），熔点 203～207℃，通常与大黄素、大黄酚共存在植物中。

伪紫红素（pseudopurpurin），熔点 222～224℃，以葡萄糖苷形式存在于某些茜草科植物根内，如染料茜草（*Rubia tinctorum*）、猪殃殃属等植物中。伪紫红素属于茜草素型蒽醌。

伪紫红素

(五) 五取代蒽醌

天然五取代蒽醌种类很多,某些昆虫、软体动物、霉菌等中存在五取代蒽醌。从 *H. catenarium* 中可以获得超过菌丝体干重15%的 catenarin(1,4,6,8–四羟基–3–甲基蒽醌)。

(六) 六取代蒽醌和七取代蒽醌

天然六取代和七取代蒽醌不多。决明子中除了含有大黄酚等蒽醌外,还含有六取代的蒽醌:橙纯叶决明素(aurantio–obtusin),熔点 265~266℃;纯叶决明素(obtusin),熔点 242~243℃;甲基纯叶决明素(chryso–obtusin)。甲基纯叶决明素的β–葡萄糖苷称为金决明苷,存在于决明种子中,能强烈抑制大鼠血小板凝集。

橙纯叶决明素　$R_1 = H, R_2 = H$

纯叶决明素　$R_1 = H, R_2 = CH_3$

甲基纯叶决明素　$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3$

七取代蒽醌 2,5,7–三羟基大黄素可能是自然界含羟基最多的蒽醌,它存在于地衣 *Mycoblastus sanguinarius* 中,它的极性很强,需要用热丙酮提取两周。

(七) 蒽环酮类抗菌素

蒽环酮类抗菌素(anthracyclinones)多来自链霉属。它们中很多具有抗肿瘤和抗菌等重要生物活性,属于抗肿瘤蒽醌类抗生素,其主要代表化合物是由放线菌(*Streptomyce speucetins*)产生的多柔比星(doxorubicin),又称阿霉素(adriamycin)和柔红霉素(daunorubicin)。

柔红霉素　$R = COCH_3$

多柔比星　$R = COCH_2OH$

二、生物活性

天然蒽醌类化合物多具有致泻作用,其作用强度与结构有下述关系:①蒽醌苷的致泻作用强于苷元。如果蒽醌类的酚羟基被酯化,则泻下作用消失;②含羧基蒽醌苷的致泻作用强于相应的不含羧基的蒽醌苷。含羧基蒽醌苷的二聚体(如番泻苷)的活性较强。蒽醌类化合物必须到达大肠才能显致泻作用。游离的蒽醌衍生物在到达大肠前,绝大多数已被吸收或破坏,所以致泻作用很弱,而蒽醌苷由于糖的作用,多可到达大肠发挥致泻作用。

蒽醌类化合物(如大黄酸、大黄素、芦荟大黄素等)有抑菌作用,苷元的作用强于苷类。蒽环酮类抗菌素具有很好的抗革兰氏阳性菌、支原体和某些酵母菌的活性,但对革兰氏阴性菌无效。由于毒性较大,它们在临床上不用于抗菌。

中药大黄对多种动物实验性炎症有明显抑制作用,且受炮制方法的影响。实验结果表明大黄素在体内容易吸收,起效快,对早期炎症渗出、毛细血管通透性增高、白细胞游走等有较好的对抗作用,对急性炎症有明显对抗作用[5]。另外大黄素对机体的正常免疫防御功能有促进作用,发挥双向调节作用[6,7]。

某些蒽醌类化合物(如大黄素,芦荟大黄素等)能清除羟基自由基,具有明显的抗氧化能力,其抗氧化能力与羟基在蒽醌上的取代位置有关[8]。通过化学发光体系检测多种活性氧,证明大黄能清除 O_2、H_2O_2 和其他活性氧,抑制脂质过氧化,是一种有效的抗氧剂[9]。

蒽环酮类抗生素主要通过作用于 DNA 而达到抗肿瘤目的。临床上柔红霉素与多柔比星主要用于治疗急性粒细胞白血病及急性淋巴细胞白血病。柔红霉素和多柔比星的主要毒副作用为骨髓抑制和心脏毒性,其产生原因可能是醌环被还原成半醌自由基,诱发了脂质过氧化反应,引起心肌损伤。多柔比星是广谱抗肿瘤药物,临床上主要用于治疗乳腺癌、甲状腺癌、肺癌、卵巢癌、肉瘤等实体瘤。

动物试验证实虎杖中大黄素具有抑制 1-硝基芘(1-NP)致突变作用和对抗 1-NP的基因毒性作用,其水提物和大黄素能显著降低 1-NP 的致突变作用,且有量效依赖关系,^{32}P 标记沙门菌 TA98 实验证实大黄素直接阻滞或抑制 1-NP 的致突变作用。

大黄素对酪氨酸蛋白激酶 PTKs 有强抑制活性。细胞活性测试表明大黄素对各种肿瘤细胞抑制作用与直接细胞毒性无关,因此大黄素是一个很好的肿瘤细胞生长抑制剂[10]。

第二节　理化性质

一、物理性质

蒽醌苷类化合物容易溶于热水和碱溶液,在甲醇、乙醇、冰醋酸及吡啶等溶剂

中溶解度较大,在冷水中溶解度较小,难溶于乙醚、甲苯、氯仿等有机溶剂。

游离蒽醌类化合物几乎不溶于冷水,微溶于冷乙醇,在热乙醇中溶解度较大,一般可溶于甲苯、氯仿、乙醚、吡啶、丙酮、冰醋酸及碱溶液。碱液中游离蒽醌产生樱红色反应,不能被有机溶剂提出;酸化后,游离蒽醌能被有机溶剂提出。

蒽醌类或其苷类大多是黄色或橙红色的晶体,在不同 pH 下可能出现不同的荧光。有一些蒽醌化合物有升华性。苷类在酸性水溶液中加热可发生水解。

二、颜色反应

含有蒽醌的生药有颜色(如大黄的根茎呈黄色),滴加氨水或其他碱液颜色加深。羟基蒽醌类化合物遇碱显红-紫色,其颜色与酚羟基和羰基形成共轭体系有关。羟基蒽醌及具有游离酚羟基的蒽醌苷均可显色,二蒽酮类化合物经过氧化形成蒽醌后才能显色。蒽醌及其苷的碱显色剂有氨气、10%氢氧化钾甲醇溶液、3%氢氧化钠溶液或碳酸钠溶液、50%哌啶甲苯溶液、饱和碳酸锂溶液等。

蒽醌类与浓硫酸反应呈红色至红紫色。

蒽醌甲醇溶液中,加 0.25%~0.5%乙酸镁甲醇溶液即显色,此溶液也可作为层析的显色剂。产生颜色的必要条件是蒽醌分子中至少存在一个α-羟基。产生的颜色随羟基的位置而改变,一般在α-羟基的对位有羟基的蒽醌与乙酸镁反应显紫色,在α-羟基的邻位有羟基的蒽醌与乙酸镁反应显蓝色,其他α-羟基蒽醌与乙酸镁反应显橙色至红色。

三、酸性

蒽醌衍生物多具有一定酸性。其酸性强弱与分子中是否存在羧基以及酚羟基的数目和位置等有关。含有羧基的蒽醌衍生物(如大黄酸)的酸性较强,可溶于 $NaHCO_3$ 水溶液。绝大多数的天然蒽醌都有羟基。羟基的位置不同,其所呈现的酸性也不同。β-羟基蒽醌中,受羰基吸电子作用的影响,β-羟基上氧原子的电子密度降低,质子解离度增高,故酸性较强,含β-羟基的蒽醌衍生物一般可溶于 Na_2CO_3 水溶液。α-羟基与相邻羰基形成分子内氢键,降低了质子的解离度,故酸性较弱,只有α-羟基的蒽醌仅溶于氢氧化钠(钾)溶液。

HO β O O
α O H O O O

某些游离蒽醌衍生物的酸性强度如下:含—COOH >含两个以上β-羟基 >含一个β-羟基 >含两个α-羟基 >含一个α-羟基。

第三节　分离方法

一、提取

中草药中经常同时含有游离的和结合成苷的蒽醌类化合物，提取前要确定将它们同时提出或分别提出。

(1) 有机溶剂提取法

取中草药粉末，用90%乙醇加热提取，提取液减压浓缩，浓缩液用氯仿等有机溶剂抽提，可获得游离蒽醌；提去游离蒽醌的溶液可进一步采用正丁醇等极性较大的有机溶剂萃取，获得蒽醌苷。

由于蒽醌类化合物大多含有羟基或羧基，在植物体内它们常以钠、钾、钙、镁等金属盐的形式存在，所以提取前常先用酸处理使之完全游离后，再用有机溶剂提取。

(2) 铅盐法

在除去游离蒽醌类化合物的水溶液中，加入乙酸铅溶液可使蒽醌苷沉出。沉淀经过过滤，水洗，悬浮于水中，通硫化氢气去铅，过滤，含蒽醌苷的滤液调至中性，蒸干。这个方法提取的蒽醌苷可用硅胶柱层析法或通过在适宜溶剂中重结晶，精制提纯。

(3) 酸碱处理法

取中草药粉末用氨水或0.1%~0.5%氢氧化钠溶液室温提取。碱提取液先用乙醚等除去脂溶性杂质。然后将水液酸化，再用乙醚等抽提，回收溶剂。残渣用甲苯、甲醇、乙醇等重结晶精制，得游离蒽醌类化合物。蒽醌苷类化合物可用碱沉淀法提取，在除去游离蒽醌的粗提物的乙醇溶液中加入KOH，使蒽醌苷以钾盐的形式从乙醇中沉淀，沉淀经乙酸处理后，得总蒽醌苷。

二、分离

中草药中的蒽醌类多以蒽醌苷状态存在，如果先水解，则全部蒽醌以游离形式得到。将生药用有机溶剂(如氯仿、甲苯)和20%硫酸回流，蒽醌全部转入有机溶剂层。然后以不同碱液(即碳酸氢钠、碳酸钠及氢氧化钠溶液)提取，分别酸化碱液，再用有机溶剂提取各类蒽醌。有机溶剂层水洗，干燥，蒸干得不同酸性的粗蒽醌，然后可通过重结晶精制。某些蒽醌类也可采用升华法进行精制。

上述依据不同蒽醌类酸性的差别，利用碱性强弱不同的水溶液(如5%碳酸氢钠液、5%碳酸钠液、1%氢氧化钠液或5%氢氧化钠水溶液等)进行梯度萃取的方法简易、经济，但是在实验室分离一些性质类似的蒽醌常要用层析法。蒽醌及其苷类衍生物可用磷酸氢钙、硅胶、聚酰胺、葡聚糖凝胶等层析法分离，一般不用氧化铝

作吸附剂,因氧化铝对羟基蒽醌吸附能力太强,难以洗脱。不同 pH 的磷酸氢钙对不同的蒽醌类化合物吸附能力不同,预先用磷酸调节到所需的酸度,可改善分离效果。

硅胶柱层析常用于分离蒽醌类化合物。应用此法分离游离蒽醌时可在硅胶中加入少量的草酸或柠檬酸,以抑制蒽醌的解离,洗脱剂可采用甲苯、乙酸乙酯、甲醇的混合溶剂;应用硅胶柱层析分离蒽醌苷类化合物时,洗脱剂可采用乙酸乙酯、甲醇、水的混合物。

聚酰胺色谱是利用蒽醌羟基与聚酰胺形成的氢键强弱程度差异来进行分离的,洗脱剂可采用甲醇。

葡聚糖凝胶色谱是依据被分离蒽醌类化合物大小进行分离的,常用的葡聚糖凝胶是 Sephadex LH-20,洗脱剂可采用甲醇或含水乙醇。

液滴逆流色谱可用于蒽醌类化合物的分离[11,12]。配合使用液滴逆流色谱和循环高压液相色谱,从蓼科植物掌叶大黄(*R. palmatum*)的根部分离得到 3 个蒽醌类化合物:大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷和大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷。

OR_2　O　OR_1　R_3　CH_3　O

大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷　R_1 = glc, R_2 = R_3 = H
大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷　R_2 = glc, R_1 = R_3 = H
大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷　R_1 = H, R_2 = glc, R_3 = OCH_3

取掌叶大黄根的薄片 50g,用苯-20%硫酸(5∶1)回流 4h, 放冷,倾出上清液,药渣用苯冲洗 2 次,液体合并,置分液漏斗中分出酸水层,苯层用水洗 3 次,再用 5%碳酸氢钠提取 3 次,合并碱提取液,用盐酸调至酸性,即有黄色沉淀生成,用升华法精制,得黄色针晶大黄酸。苯层再用 5%碳酸钠提取 3 次,合并碱液,用盐酸调至酸性,有黄色沉淀生成,沉淀在 1.6kPa 下减压升华,得橙色针状结晶大黄素。苯层再用 5%氢氧化钾液提取 3 次,碱液合并,用盐酸调至酸性,得橙色沉淀,用氯仿洗涤多次,为芦荟大黄素粗品,氯仿溶液用 0.5%氢氧化钾液提取 2 次,碱液合并,盐酸调至酸性,得红色沉淀,为芦荟大黄素粗品,粗品用甲苯重结晶,得橙色针状结晶。氯仿层用 5%氢氧化钾提取至水层近无色,合并碱液,用盐酸调至酸性,得浅黄色沉淀,此沉淀经纤维素粉柱层析法分离,用水饱和的石油醚洗脱,分段收集,合并相同组分,浓缩后用乙酸乙酯重结晶,得大黄酚和大黄素甲醚[13]。

第四节　波 谱 分 析

一、紫外和可见光谱

蒽醌类化合物高度不饱和的母核使其在紫外和可见光区具有多个吸收带,这些紫外和可见吸收峰的位置和吸收强度与蒽醌类化合物的取代有一定的关系,这对于推测其取代类型有参考价值。

蒽醌紫外光谱的 4 个吸收峰(252nm、325nm 和 272nm、405nm)分别由蒽醌的苯样结构和醌样结构引起。

苯样结构　　醌样结构

天然蒽醌多数有羟基取代,羟基蒽醌类化合物的紫外光谱主要有 5 个紫外吸收峰:Ⅰ吸收峰 230nm 左右;Ⅱ吸收峰 240~ 260nm(由苯样结构引起);Ⅲ吸收峰 262~ 295nm(由醌样结构引起);Ⅳ吸收峰 305~ 389nm(由苯样结构引起);Ⅴ吸收峰 >400nm(由醌样结构中 C═O 引起)。

羟基蒽醌类化合物的紫外吸收峰位和吸收强度与蒽醌母核上的取代基的性质、数量及排列方式有关。蒽醌母核上带有一个酚羟基时,Ⅰ吸收峰 λ_{max} 为 222.5nm,当蒽醌母核上酚羟基数目增加,该吸收峰向长波长方向位移。Ⅲ吸收峰 lgε值大于 4.1,提示蒽醌母核上存在β-酚羟基;否则,无β-酚羟基存在。当蒽醌母核α-位上有—CH_3、—OH、—OCH_3 时,Ⅳ吸收峰峰位红移,但强度降低;当上述取代基处于β-位时,则该峰吸收强度增高。α-羟基的数目对可见光区的吸收峰影响较大。例如,蒽醌类化合物含一个α-羟基,400~ 420nm 处出现吸收峰;含两个或两个以上α-羟基,则将在 430nm 以上出现吸收峰,且吸收峰的数目随α-羟基数目的增加而增多。

蒽醌类化合物的紫外-可见光谱提供的信息对其结构推测有一定的用途,但由于例外较多,所以其紫外-可见光谱数据通常仅作为结构分析的旁证证据。

二、红外光谱

羟基蒽醌红外光谱特征是 1670cm^{-1} 附近有羰基的伸缩振动吸收,3150~3600cm^{-1} 区间有羟基的伸缩振动吸收,1480~ 1600cm^{-1} 区间有苯环的骨架振动吸收。

未取代蒽醌两个羰基的化学环境相同,故红外光谱中仅有一个 C═O 吸收

峰,频率为 1675cm^{-1}(石蜡糊)。不含α-OH 蒽醌化合物的 $\nu_{C=O}$ 一般在 1653~1679cm^{-1}之间。该吸收峰受吸电子基的影响将向高频率方向位移,受给电子基的影响将向低频率方向位移。含一个α-羟基的蒽醌衍生物,因一个 C ═O 可与α-羟基生成氢键,两个 C ═O 的化学环境有明显的差别,它的 IR 谱上出现两个 C ═O 峰,分别在 1660cm^{-1}和 1630cm^{-1}附近,两峰的频率差约 30cm^{-1}。1,8-二羟基蒽醌类衍生物,有两个 $\nu_{C=O}$ 峰,一个未缔合的 $\nu_{C=O}$ 峰出现在 1661~ 1678cm^{-1},另一个缔合的C ═O吸收峰向低波数移动,出现在 1616~ 1626cm^{-1},两峰的频率差为 40~57cm^{-1}。1,4-或 1,5-二羟基蒽醌类化合物,两个羰基都已缔合,故其红外光谱中在 1608~ 1645cm^{-1}只出现一个缔合 $\nu_{C=O}$ 峰。含 3 个或 4 个α-羟基的蒽醌化合物通常只能观察到一个低频率的缔合 C ═O 峰,该峰有时与 C ═C 骨架振动频率相重叠。

含α-羟基的蒽醌化合物中的α-羟基因与羰基缔合,其吸收峰出现在 3150cm^{-1},多与不饱和 C—H 伸缩振动频率重叠。

三、质谱

蒽醌类化合物的质谱中,分子离子峰总是强峰。蒽醌的分子离子峰为基峰。蒽醌的质谱特征是相继失去两分子一氧化碳,形成 m/z 为 180(M - CO)及 m/z 为 152(M - 2CO)的强峰。一羟基蒽醌和二羟基蒽醌除了有(M - OH)离子以外,还分别有(M - 3CO)和(M - 4CO)等强峰。α-甲氧基蒽醌的质谱中会出现(M - CHO)强峰。蒽醌苷用常规电子轰击质谱得不到分子离子峰,其基峰一般为苷元离子。

四、核磁共振谱

蒽醌母核芳氢的核磁共振信号可分为两类:α-芳氢处于 C ═O 的负屏蔽区,受 C ═O 的影响较大,共振发生在较低磁场区,峰中心在 δ 8.07ppm 左右;β-芳氢受 C ═O 的影响稍小,共振发生在较高磁场处,峰中心在 δ 6.67ppm 附近。

取代蒽醌 NMR 谱中,芳香环上孤立氢表现为单峰。相邻两个氢,应出现相互邻偶的两重峰($J_{邻}$ = 6.0~ 9.4Hz),间位芳氢(两个芳氢中间碳上的取代基为—OR、—OH 或—COOH 等)应有两个二重峰($J_{间}$ = 0.8~ 3.1Hz)。蒽醌衍生物中取代基的性质、数目和位置对芳氢的化学位移、峰形均产生影响;蒽醌母核也影响取代基上质子的化学位移和峰形。蒽醌衍生物中,芳香甲基作为给电子基可使相邻芳氢的 δ值减小约 0.15ppm,使间位芳氢的 δ值减小约 0.10ppm。—CH_3 可与相邻芳氢发生丙烯偶合(J = 0.6~ 0.9Hz),当核磁共振分辨率较低时,甲基峰与芳氢峰的宽度加大。芳香羟基和甲氧基为给电子基,它们可使其邻位及对位芳氢向高磁场位移约 0.45ppm;与芳环相连的羟甲基中的亚甲基质子的 δ值约

4.6ppm，呈单峰，有时呈双峰；—COOH 则使邻位芳氢向低磁场位移约 0.8ppm。

蒽醌中的α-羟基与羰基形成氢键，其^{1}H-NMR 信号出现在低场。当分子中只有一个α-羟基时，其化学位移值大于 δ12.25ppm。当两个羟基位于同一羰基的α-位时，分子内氢键减弱，其信号在 δ11.6～12.1ppm。邻位有取代的α-羟基质子的化学位移值小于 δ10.9ppm。

^{13}C-NMR 在蒽醌类化合物的鉴定中有重要地位。蒽醌母核的碳原子可分为四类，无取代蒽醌中这些碳的化学位移值如下：α-碳，126.6ppm；β-碳，134.3ppm；羰基碳，182.5ppm；季碳，132.9ppm。

蒽醌母核仅一个环上有取代基，而另一个环无取代基时，无取代基环上各个碳原子的 δ值变化很小，即取代基的跨环影响不大，在预测蒽醌结构类型时，可不考虑另一环上取代基对所研究环的影响[14]。

蒽醌母核上取代基的性质、数目和位置不同，对被取代碳的 δ值产生不同的影响。α-甲基、β-甲基、α-乙酰氧基及β-乙酰氧基取代对蒽醌^{13}C-NMR 取代基的位移值见表 13-1。

表 13-1　蒽醌^{13}C-NMR 的取代基位移值 Δδ(单位：ppm)

C	C_1—OH	C_2—OH	C_1—OCH_3	C_2—OCH_3	C_1—CH_3	C_2—CH_3	C_1—OAc	C_2—OAc
C-1	34.7	-14.4	33.2	-17.1	14	-0.1	23.6	-6.5
C-2	-10.6	28.8	-16.1	30.3	4.1	10.1	-4.8	20.6
C-3	2.5	-12.8	0.8	-12.9	-1.0	-1.5	0.3	-6.9
C-4	-7.8	3.2	-7.4	2.5	-0.6	-0.1	-1.1	1.8
C-5	0	-0.1	-0.7	-0.1	0.5	-0.3	0.3	0.5
C-6	0.5	0.0	-0.9	-0.6	-0.3	-1.2	0.7	-0.3
C-7	-0.1	-0.5	0.1	-0.1	0.2	-0.3	-0.3	-0.5
C-8	-0.3	-0.1	0	-0.1	0	-0.1	0.4	0.6
C-9	5.4	0	-0.7	0	2.0	-0.7	0.9	-0.8
C-10	-1.0	-1.5	0.3	-1.3	0	-0.3	-0.4	-1.1
C-10a	0	0	-1.1	0.3	0	-0.1	-0.3	-0.3
C-8a	1.0	0.2	2.2	0.2	0	-0.1	2.0	0.5
C-9a	-17.1	2.2	-12.0	2.1	2.0	-0.2	-7.9	5.4
C-4a	-0.3	-7.8	1.4	-6.2	-2.0	-2.3	1.6	-1.6

按表 13-1 所归纳的取代基位移值进行推算，蒽醌母核上每个环上仅有一个取代基时，实验值与推算值误差一般在 0.5ppm 以内。当两个取代基在不同环时，则会产生较大的偏差，需对表 13-1 中数据做修改。如果取代基为—OH 或

—OCH_3 时，1，3–二取代蒽醌，C–2，－3ppm；C–4，＋4ppm；1，4–二取代蒽醌，C–1、C–3，＋3ppm；C–2，＋2ppm；C–4，＋2.5ppm；C–13、C–14，－1.6ppm。

^{13}C–NMR 的取代基位移规律可用于解析多种取代蒽醌的结构[15]，但对某些蒽醌，应用该方法误差较大。此时，运用^{1}H–^{13}C 远程相关谱可有效地解析其结构。

第五节 研究实例[16～18]

毛线柱苣苔（*Rhynchotechum vestitum* Hook. f. et. Thoms.）为苦苣苔科（Gesnericeae）线柱苣苔属的多年生半灌木植物，主要分布在中国云南南部，当地民间用该植物的根茎治疗甲型肝炎和乙型肝炎。

毛线柱苣苔粗粉，用 95% 乙醇渗漉，减压浓缩，浸膏在水和氯仿两相间分配。氯仿液用 5% 碳酸钠溶液萃取，自碳酸钠溶液部位分得 3 个蒽醌化合物：茜根定 rubiadin、茜根定–1–甲醚（rubiadin–1–methyl ether）和新化合物毛线柱苣苔蒽醌（rhynchotechol）。浸膏萃取后的水相用大孔树脂处理，30% 乙醇洗脱部位经硅胶柱层析，得游离蒽醌门衣司亭–1–甲醚（munjistin–1–methyl ether）及 5 个蒽醌苷，即茜根定–3–*O*–β–葡萄糖苷（rubiadin–3–*O*–β–glucoside）、光泽汀–3–*O*–β–葡萄糖苷（lucidin–3–*O*–β–glucoside）、光泽汀–1–甲醚–11–*O*–β–葡萄糖苷（lucidin–1–methyl ether–11–*O*–β–glucoside）、光泽汀–3–*O*–β–樱草糖苷（lucidin–3–*O*–β–primeveroside）和茜根定–1–甲醚–3–*O*–β–樱草糖苷（rubiadin–1–methyl ether–3–*O*–β–primeveroside），见表 13–2。上述大孔树脂 50% 乙醇洗脱部位经进一步硅胶柱层析，分离得到茜根定–3–*O*–β–樱草糖苷（rubiadin–3–*O*–β–primeveroside）。另取乙醇浸膏经石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取后的水相用大孔树脂处理，分离得到 6–羟基茜根定（6–OH–rubiadin）。乙酸乙酯部位经硅胶柱层析，分离得到 1，3–二羟基–2–乙氧羰基–9，10–蒽醌（1，3–dihydroxy–2–carboethoxy–9，10–anthraquinone）。上述化合物中门衣司亭–1–甲醚和光泽汀–1–甲醚–11–*O*–β–葡萄糖苷是新化合物。

毛线柱苣苔蒽醌　　　　6–羟基茜根定

（1）毛线柱苣苔蒽醌的结构鉴定

毛线柱苣苔蒽醌，橙色结晶，熔点 236.5～238℃（乙醇）；由高分辨质谱得分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$；UVλ_{max} 在 222nm、281nm、413nm 有吸收，提示其为羟基蒽醌。IRν_{max}数据显示存在游离羟基（3353cm^{-1}）以及非缔合（1656cm^{-1}）和缔合（1630cm^{-1}）

表 13-2　化合物的名称及结构

名称	R_1	R_2	R_3
茜根定	OH	CH_3	OH
茜根定-1-甲醚	OCH_3	CH_3	OH
门衣司亭-1-甲醚	OCH_3	COOH	OH
1,3-二羟基-2-乙氧羰基-9,10-蒽醌	OH	COOEt	OH
茜根定-3-*O*-β-葡萄糖苷	OH	CH_3	*O*-β-glc
光泽汀-3-*O*-β-葡萄糖苷	OH	CH_2OH	*O*-β-glc
光泽汀-1-甲醚-11-*O*-β-葡萄糖苷	OCH_3	CH_2O-β-glc	OH
茜根定-1-甲醚-3-*O*-β-樱草糖苷	OCH_3	H	*O*-β-prim
光泽汀-3-*O*-β-樱草糖苷	OH	OH	*O*-β-prim
茜根定-3-*O*-β-樱草糖苷	OH	H	*O*-β-prim

注：prim = -D-xylopyranosyl；glc = glucopyranosyl(葡萄糖)。

两个羰基。^{1}H-NMR 提示分子中含有 5 个取代基：α-OH（δ13.37ppm）、β-OH（δ6.45ppm，加重水后消失）、β-CH_3[δ2.25ppm(3H，s)、一般α-CH_3 在δ2.8ppm附近、β-CH_3 在 δ2.4ppm 附近]，以及两个—OCH_3[δ4.1ppm(3H，s)，δ4.0ppm(3H，s)]。^{1}H-NMR 还显示分子中含有 1 个α-H[δ7.68ppm(s)]及两个相互偶合的邻位芳氢[δ7.68ppm 和 δ7.45ppm(d，J = 8Hz)]，其中δ7.45ppm的信号与δ2.35ppm的β-CH_3 具有相同的 $W_{1/2}$，提示两者存在丙烯型偶合；毛线柱苣苔蒽醌的 MS 中有 m/z 为 181、m/z 为 135、m/z 为 153、m/z 为 107 等裂解碎片峰，根据羟基蒽醌的质谱裂解规律，该化合物中 5 个取代基的取代位置如下

毛线柱苣苔蒽醌

为了确定左侧芳香环上 3 个取代基的位置，用 $SnCl_2$-HCl(conc.)还原毛线柱

苣苔蒽醌的10-位羰基为亚甲基。比较两者的[1]H-NMR发现4-H、5-H分别向高场位移了约1ppm,表明原蒽醌非缔合羰基两侧均无取代基,即孤立的α-H应处于C-5位。余下两个—OCH_3和一个β-OH的位置是通过NOE技术(照射β-OH,观察5-H的增益),推定毛线柱苣苔蒽醌的结构为1,6-二羟基-2-甲基-7,8-二甲氧基-9,10-蒽醌。最后通过HMQC和HMBC确定了其结构,并对各碳信号进行了归属。

(2) 门衣司亭-1-甲醚的结构鉴定

门衣司亭-1-甲醚为黄色结晶,熔点270℃(分解),分子式$C_{16}H_{10}O_6$,对$FeCl_3$和KOH的显色反应及其UV中有λ_{max}在243nm和283nm的吸收峰,提示其为羟基蒽醌;EI-MS出现m/z为281[M-OH]$^+$和[M-CO_2]$^+$碎片峰,表明存在—OH和—COOH取代,而m/z为280[M-H_2O]$^+$的碎片峰提示羟基可能在羧基的邻位,因这种取代模式有利于两个取代基通过六元环的过渡态脱去1分子H_2O;[1]H-NMR中δ3.80ppm(3H, s)表明第三个取代基为—OCH_3,δ7.16(1H, s)和δ7.79~7.87ppm及δ8.07~8.13ppm(4H, m,对称的AA′BB′芳香质子)表明该蒽醌母核上一个芳香环未取代,而另一个芳香环取代了—OH、—COOH、—OCH_3;该蒽醌IR中有ν_{max}为1675.9cm^{-1}和1654.7cm^{-1}吸收峰以及碳谱中有两个羰基碳的信号(δ179.0ppm和δ183.2ppm),表明两个蒽醌羰基均未缔合,羟基应取代在β-位。孤立的芳氢(δ7.16ppm)应为α-H(H-4),它比典型的α-H(δ8.07ppm)向高场位移了约0.9ppm,这主要是由于其邻对位(C-3, C-1)上—OH和—OCH_3的给电子效应的影响。由于—OCH_3和H-4间没有观察到NOE效应,所以其结构推定为2-羧基-3-羟基-1-甲氧基-9,10-蒽醌(门衣司亭-1-甲醚),此结构最后进一步通过HMBC证实。

(3) 光泽汀-1-甲醚-11-*O*-β-葡萄糖苷的结构鉴定

光泽汀-1-甲醚-11-*O*-β-葡萄糖苷,淡黄色结晶,熔点218~220℃(甲醇),分子式为$C_{22}H_{22}O_{10}$;UV中有λ_{max}为241nm,275nm和335nm的吸收峰;IR中有ν_{max}为3591cm^{-1}、1670cm^{-1}和1583cm^{-1}处的吸收峰,提示该化合物为羟基蒽醌的糖苷;[1]H-NMR信号中δ3.877ppm(3H, s)、δ4.599ppm和δ4.892ppm(AB系统,各1H, d, J=10.1Hz)以及[13]C-NMR信号中δ162.0ppm和δ162.5ppm(含氧取代的芳香碳)、δ59.2ppm(含氧取代的脂肪仲碳)表明其蒽醌母核具有3个取代基(—OCH_3、—OH和—CH_2OH)。4个芳香质子(AA′BB′类型)和1个孤立的α-芳香质子表明该化合物蒽醌母核上的取代基分布在1-、2-、3-位。鉴于该植物中分离得到的蒽醌类化合物如果取代基集中分布在一个环上,则含碳取代基总β-位,从生源上考虑,羟甲基暂定在C-2位。由于—OCH_3和H-4之间没有NOE效应,所以推测—OCH_3和—OH分别连在1-位和3-位。通过与已知蒽醌化合物(光泽汀-1-甲醚-3-*O*-β-樱草糖苷)比较碳谱,发现该蒽醌化合物苷元的碳谱与已知物相比有如

下明显的差别:C-11 的信号明显向低场位移(-7.2ppm);C-3 和 C-9a 的信号明显向高场位移;糖的异头碳信号向低场位移 2ppm;该化合物的异头氢信号向高场位移了约 0.8ppm。以上证据提示糖连在醇羟基(OH-11)上而不是酚羟基(OH-3)上。根据异头氢 H-1′的 *J* 值(7.8Hz),参考糖部分的 ^{13}C-NMR 数据,确定所连糖为葡萄糖,其糖苷键为β-构型。该化合物的结构定为光泽汀-1-甲醚-11-*O*-β-葡萄糖苷。最后通过 HMQC 和 HMBC 归属了所有碳氢信号,进一步证实了所推定的上述结构。

参　考　文　献

[1] Thomson R H. Naturally occurring Anthraquinones(2nd ed). New York:Academic Press Inc, 1971
[2] 徐任生, 叶阳, 赵维民. 天然产物化学(第二版). 北京: 科学出版社, 2004
[3] 郝延军, 桑育黎, 赵余庆. 中草药, 2003, 34(1):18
[4] 向兰, 郑俊华, 果德安等. 中草药, 2001, 32(5):395
[5] 李云森, 王峥涛, 罗士德等. 中国药科大学学报, 2001, 32(5):342
[6] 祁红. 中草药, 1999, 30(7):522
[7] 张俊, 翁福海, 李会强等. 中草药, 2001, 32(8):718
[8] 蔡胜秀. 中国中医药信息杂志, 1997, 4(3):23
[9] Yeng C, Duh P D, Chuang D Y. Food Chemistry, 2000, 70:437
[10] 陈季武, 胡天喜. 中国药学杂志, 1996, 31(8):461
[11] 尚明英, 马详君, 蔡少青. 中草药, 1997, 28(7):433
[12] Marston A, Potterat O. J Chromatogr, 1988, 450(1):3450
[13] Marston A, Chapuis J C, Sordat B et al. Planta Med, 1986, (3):207
[14] 阚毓铭. 中药化学实验操作技术. 北京:中国医药科技出版社, 1988, 149
[15] 刘光明, 丁维功, 陈泽乃. 国外医药——植物药分册, 1989, 4(3):98
[16] Itokawa H, Mihara K, Takeya K. Chem Pharm Bull, 1983, 31:2353
[17] 刘光明, 陈泽乃, 姚天荣等. 药学学报, 1990, 25(9):699
[18] Lu Y, Xu P, Chen Z N et al. Phytochemistry, 1998, 47(2):315

第十四章　香豆素类化合物

第一节　概　　述

香豆素类(coumarins)是一类具有芳甜香气的天然产物,其母核是由顺式邻-羟基桂皮酸所形成的内酯,称苯骈-α-吡喃酮(benzo-α-pyrone)或苯骈-1,2-吡喃酮(benzo-1,2-pyrone)。

顺式邻羟基桂皮酸　　　　香豆素

香豆素类可以游离态或成苷形式存在于植物界,分布于 30 以上的科,约 150 种植物,其中以双子叶植物中的伞形科(Umbelliferae)、芸香科(Rutaceae)和桑科(Moraceae)含量最多,也存在于豆科(Leguminosae)、木犀科(Oleaceae)、茄科(Solanaceae)、菊科(Compositae)和兰科(Orchidaceae)中。

香豆素类在自然界的特点是数量和类型较多。自 1812~ 1996 年,已有文献报道 4250 篇之多,涉及结构数达 1900 个以上(包括部分重复)[1~4]。

近年来,随着现代色谱和波谱技术的应用和发展,发现了不少新的结构类型,如 prenyl-furocoumarin 型倍半萜衍生物[5] 以及含亚乙二氧基(ethylenedioxy)的新香豆素[6] 等。此外,也发现某些罕见的结构,如香豆素的硫酸酯、无含氧取代如 3,4,7-三甲基香豆素和四氧取代的香豆素。

在分离手段上,不少新方法、新技术近年也被应用。例如,超临界流体萃取、制备型加压(低、中、高)和减压色谱、毛细管电泳等。在结构鉴定上,2D-NMR 已被普遍采用。

在合成上,近年也报道了不少更简便、得率更高的方法[7],包括某些一步合成法[8]。合成了光学活性的双香豆素(+)和(-)-isokotanin A[9],取代于 C-6 或 C-7 的具有第三代维甲结构(二苯乙烯结构)的新香豆素[10],以及一系列新的 3-溴-4-甲基-7-甲氧基-8-氨基香豆素的衍生物,用于抗肿瘤活性的筛选[11] 等。

在生物活性上,香豆素呈现其多样性。例如,已知新生霉素的抗菌活性、呋喃香豆素的光敏作用以治疗牛皮癣和蕈样霉菌病、双香豆素的抗凝血活性以及可致肝脏毒性的黄曲霉素等。近年又分得一系列能抑制 HIV-1 逆转录酶的胡桐内酯类(calanolides)[12],能显著扩张血管的凯林内酯类(khellactones)[13]。最近,还发现某些香豆素能抑制 NO 合成[14~16] 和具有植物雌激素活性[17],并对线性呋喃香

豆素的光毒活性次序进行了筛选[18]。

第二节　结构类型

香豆素的分类通常是按生源途径所形成的几种基本骨架来分。一般可分为四大类:简单香豆素、呋喃香豆素、吡喃香豆素和其他香豆素。

一、简单香豆素类

简单香豆素类是指只在苯环上有取代基的香豆素,大都在 C–7 有含氧官能团,仅少数例外,故 7–羟基香豆素即伞形花内酯(umbelliferone)可认为是香豆素类的母体。

香豆素母体在植物体内可来自苯丙氨酸(phenylalanine)或酪氨酸(tyrosine),伞形花内酯的可能生源途径之一可表示如下

HO, COOH, NH_2 —脱氨→ HO, COOH —2′-羟基化→ HO, COOH, OH —糖苷化→ HO, COOH, O—glu —异构化→ HO, COOH, O-glu —去糖→ HO, OH, COOH —内酯化→ HO, 1–10, O, O

伞形花内酯中苯环的 C–5、C–6、C–8 位都可能有含氧基团取代,常见的为羟基、甲氧基、亚甲二氧基、异戊烯氧基等,异戊烯基除接在氧上外,也可直接连在碳上。

常见的简单香豆素列举如下

7–*O*–取代

RO, 7, O, O

R	
H	伞形花内酯(umbelliferone)
glu	茵芋苷(skimmin)

5,7–二 *O* 取代

OMe, 5, R_1, MeO, 7, R_2, O, O

R_1	R_2	
H	H	白柠檬素(limettin)
H	(异戊烯基)	九里香内酯(coumarayin)
(3-甲基-2-丁烯酰基)	H	当归内酯(angelicone)

6,7-二 *O* 取代

R_1	R_2	
H	H	七叶内酯(esculetin)
Me	H	东莨菪内酯(scopoletin)
Me	β-glu	东莨菪苷(scopolin)
Me	Me	滨蒿内酯(scoparone)

7,8-二 *O* 取代

瑞香内酯(daphnetin)

二、呋喃香豆素类

7-羟基香豆素的6-位或8-位有异戊烯基时,容易与邻位酚羟基环合形成呋喃环或吡喃环,前者为呋喃香豆素类(furanocoumarins),后者为吡喃香豆素类(pyranocoumarins),每类又可再分成两种:环处于与母体同一直线上,称为线形(linear);环处于母体的折角线上,称为角形(angular)。

由伞形花内酯形成呋喃香豆素和吡喃香豆素的生源过程如下

(+)-marmesin

补骨脂内酯
(psoralen)

demethylsuberosin

花椒内酯
(xanthyletin)

伞形花内酯
(umbelliferone)

白芷内酯
(angelicin)

(−)-columbianetin

osthenol

邪蒿内酯
(seselin)

(一) 6,7-呋喃骈香豆素类

补骨脂内酯是6,7-呋喃骈香豆素即线形呋喃香豆素类的代表,故该类又称补骨脂内酯型香豆素。在线形呋喃香豆素中的含氧基或异戊烯氧基常位于C-5和C-8位。例如

R_1	R_2	
H	H	补骨酯内酯(psoralen)
OMe	H	香柑内酯(bergapten)
H	OMe	花椒毒内酯(xanthotoxin)
OMe	OMe	异茴芹内酯(isopimpinellin)
H	—O—	欧前胡内酯(imperatorin)

线形呋喃香豆素也能以未降解的二氢呋喃香豆素形式存在。

(二) 7,8-呋喃骈香豆素类

白芷内酯又名异补骨脂内酯(isopsoralen)是角形的7,8-呋喃骈香豆素类的代表,故该类又称异补骨脂内酯型香豆素。角形呋喃香豆素中的含氧基或异戊烯氧基常位于C-5和C-6位,例如

R_1	R_2	
H	H	白芷内酯(angelicin)
OMe	H	异香柑内酯(isobergapten)
OMe	OMe	茴芹内酯(pimpinellin)

角形呋喃香豆素同样也能以未降解的二氢呋喃香豆素存在。

三、吡喃香豆素类

吡喃香豆素也有线形和角形两种,即6,7-吡喃骈香豆素和7,8-吡喃骈香豆素。

(一) 6,7-吡喃骈香豆素类

6,7-吡喃骈香豆素类以花椒内酯为代表,常见的化合物是在花椒内酯的C-5、C-8位上连有含氧基或异戊烯基。例如

R_1	R_2	
H	H	花椒内酯(xanthyletin)
OMe	H	美花椒内酯(xanthoxyletin)
H	OMe	鲁望橘内酯(luvangetin)
OMe		枸橘内酯(poncitrin)

(二) 7,8-吡喃骈香豆素类

7,8-吡喃骈香豆素类以邪蒿内酯为代表,含氧基常见连于 C-5 或 C-6 位上,例如

R_1	R_2	
H	H	邪蒿内酯(seselin)
OH	H	5-羟基邪蒿内酯(5-hydroxyseselin)
H	OMe	布拉易林(braylin)

近年从前胡属(*Peucedanum* L.)植物根中分得一系列角形二氢吡喃骈香豆素化合物,它们为凯林内酯 (khellactone)的一酰化或二酰化衍生物,有的具有冠状动脉扩张作用[13],其活性特点是 C-3′ 和 C-4′ 为顺式构型。凯林内酯(R_1 = R_2 = H)有多种立体构型。如下所示

凯林内酯衍生物(通式)

(+)-顺式 3′(*R*) 4′(*R*)　(-)-顺式 3′(*S*) 4′(*S*)　(-)-反式 3′(*R*) 4′(*S*)　(+)-反式 3′(*S*) 4′(*R*)

例如,从中药白花前胡(*Peucedanum praeruptorum* Dunn)根中分离得到前胡香豆素 A~ E (qianhucoumarin A~ E)[19~21];从南岭前胡(*Peucedanum longshengense* Shan et Sheh)中则分离得到南岭前胡 A (longshengensin A)[22]。其成酯的酰氧基常见的有乙酰氧基(acetoxy)、当归酰氧基(angeloyloxy)、惕各酰氧基(tigloyloxy)、2-甲基丁酰氧基(2-methylbutyryloxy)、异戊酰氧基(isovaleryloxy)、千里光酰氧基(senecioxy)等。近年证实白花前胡丙素(praeruptorin C)可降低心脏对氧的需求,可能为前胡抗心绞痛的机制之一[23]。

前胡香豆素 A
(+)-3′(*R*)-hydroxy-4′(*R*)-tigloyloxy-3′,4′-dihydroseselin

南岭前胡 A
(-)-3′(*S*)-acetoxy-4′(*S*)-angeloyloxy-3′,4′-dihydroseselin

四、其他香豆素类

其他香豆素类为α–吡喃酮环的 C–3、C–4 位上有取代基的香豆素、胡桐内酯类以及香豆素的二聚体等。

(一) C–3、C–4 取代衍生物

除 3–苯代和 4–苯代外，也有以 3,4–苯骈的结构存在。例如

异甘草香豆素
(isoglycycoumarin)

胀果香豆素甲
(inflacoumarin A)

autumnariniol

4–氧代香豆素常以 OH 或 OMe 取代存在，4–羟基和 3–苯代两者还能构成一类称为香豆草醚类(coumestans)化合物。例如，从中药旱莲草(*Eclipta prostrata* L.)中分得一系列蟛蜞菊内酯(wedelolactone)衍生物，其中包括新化合物异去甲蟛蜞菊内酯[24]。

R = CH_3 蟛蜞菊内酯(wedelolactone)
R = H 去甲蟛蜞菊内酯
(demethylwedelolactone)

异去甲蟛蜞菊内酯
(isodemethylwedelolactone)

新生霉素(novobiocin)则是 4,7–二羟基香豆素的含 N 糖苷，为链霉菌的代谢产物，用作抗生素。

新生霉素

4–OH 还可与 3–位的异戊二烯单位链形成一类新的 prenyl–furocoumarin 型倍

半萜衍生物,如最近从多伞阿魏(*Ferula ferulaeoides*)中分离得到多种此类化合物[5]。4-OH 也可在 3,4-位构成一类色原酮香豆素(chromocoumarin),如存在于远志属植物 *Polygala fruticosa* 中具有抗菌活性的 frutinone A。

prenyl-furocoumarin 型倍半萜衍生物
(prenyl-furocoumarin type sesquiterpenoid derivative)

frutinone A

(二) 胡桐内酯类

胡桐内酯类(calanolides)是近年从藤黄科(Guttiferae)胡桐属(*Calophyllum* L.)植物中分得的一类香豆素,这是一类新的非核苷型的 HIV-1 逆转录酶抑制剂。其基本结构为 4-烷基(甲基或丙基)或苯基取代的 5,6-位和 7,8-位双吡喃骈香豆素。胡桐内酯类可分为三种类型[12],即偕二甲基可在 C 环(如 calanolide A),或 D 环(如 pseudocordatolide C),或 D 环未成环(如 callophylloide)。分离自 *Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* 的(+)-calanolide A 是该类活性结构的代表物[25]。研究表明 C-10 和 C-11 的两个甲基处于反式及 12-β-OH 是活性的重要基础[26]。(±)-calanolide A 的全合成[27] 及其光学活性物的合成[28] 均已有报道。

(+)-calanolide A

(+)-pseudocordatolide C

海棠果内酯
(callophylloide)

(三) 二聚体类

败坏翘摇素(dicoumarol)是早就被发现具有抗血小板聚集活性的双香豆素,其后不少新二聚体相继被发现。既有简单香豆素之间相连,也有吡喃香豆素之间以线-线型或线-角型相连。连接方式既可以是直接相连,也可以是通过氧、亚甲基或某一结构单位相连,如败坏翘摇素即以 C-3-CH_2-C-3′形式连接。连接的位置也不尽相同,但较多的是一个香豆素的 C-8 与另一香豆素的 C-3、C-5、C-6、C-8 直接相连。

OH　OH　3　3′　O　O　O　O

败坏翘摇素(dicoumarol)

近年报道了不少新双香豆素被发现,如从瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)中分得一 8–6′ 直接相连的新双香豆素 bicoumastechamin[29],从中药蛇床[*Cnidium monnieri* (L.) Cusson]中则分得两个(8–8′和 8–5′)非直接相连的新双香豆素 cnidimonal 和 cnidimarin[30]。最近从黄连木(*Pistacia chinensis* Bunge)分离得到一新的 4–芳基二氢香豆素 3–3 二聚体,则具有雌激素样活性[17]。体外试验表明该双香豆素对雌激素受体的结合能竞争性对抗[^{3}H]雌二醇,可见双–4–芳基香豆素有可能成为一种新类型的植物雌激素。

第三节　理 化 性 质

游离香豆素通常为结晶固体,具芳香气味,有一定熔点,能随水蒸气挥发或升华。香豆素不溶或难溶于水,但可溶于石油醚、苯、乙醚、氯仿或乙醇等溶剂中。

(一) 荧光

香豆素在紫外光下,常显蓝色荧光,故很容易辨认它的存在。C–7 位引入羟基可使荧光增强。一般羟基香豆素遇碱后,荧光会加强,有的可使荧光变色,如 7–羟基香豆素加碱后,荧光可从蓝色变绿色。一般非羟基取代或羟基醚化后可使荧光减弱,并转为紫色。呋喃香豆素的荧光一般较弱。曾报道甲氧基香豆素的结构与荧光强度和呈色之间的关系,可作参考[31]。

(二) 与碱反应

香豆素用热稀碱液处理,其内酯环可缓慢水解开裂,成为顺邻羟基桂皮酸盐而溶解成一黄色溶液。如果再酸化,生成的游离顺邻羟基桂皮酸极不稳定,可闭环重新内酯化,得到原来的香豆素。如果香豆素长时间放置在碱液中,则顺式盐可转变为反式盐,此时再酸化,就不再内酯化而可得稳定的反邻羟基桂皮酸。

O　O　稀OH^-　热　COO^-　O^-　H^+　COOH　OH　O　O

OH^-　长时间加热

COO^-　O^-　H^+　COOH　OH

(三) 与酸反应

香豆素受酸作用,可进行多种反应,例如:

1. 烯丙基醚的开裂

不少香豆素常含有异戊烯基(prenyl)、牻牛儿基(geranyl)或法呢基(farnesyl)等成醚结构,其中均存在烯丙基醚部分,在温和的酸性条件下,短时间微热,就能水解成酚羟基。

2. 烯键水化

在酸催化下,香豆素分子侧链中的双键可被水化,导入羟基。例如,高毒性的黄曲霉素(aflatoxin, AF)B_1 经酸催化加水可生成低毒性的黄曲霉素 B_{2a}。这一反应提示酸处理有可能是被此类所污染食品去毒的一种方法。反应如下

OMe O O O H H O O $\xrightarrow{H^+}$ OMe O O O O O OH

AFB_1 AFB_{2a}

第四节 提取和分离

一、提取

石油醚对大多数含氧香豆素的溶解性并不好,但可用以除去其他脂溶性成分,对以后的处理十分有用。

乙醚虽可溶解多数香豆素,但能溶出的其他脂溶性成分也多,特别当用叶为原料时,则常与叶绿素、蜡质等混溶在一起,一个除去叶绿素等脂溶性成分的有效例子[1]是圆当归(*Angelica archangelica* L.)新鲜叶子中虽含有众多呋喃香豆素,但常与叶绿素等混溶于沸甲醇中,此时可将其滤液调节成 60%甲醇水溶液,用正己烷洗涤 2 次以除去叶绿素和其他脂溶性物质。正己烷洗液可用 60%甲醇水溶液反萃取 1 次,并入所要的甲醇液中。浓缩甲醇水溶液,然后用乙醚萃取,即可得香豆素。也可在开始时不先除去脂类和蜡。而是将含香豆素的植物原料用丙酮提取,提取液浓缩至原体积的 1/3,过滤除去析出的焦油。丙酮蒸干后,残渣溶于氯仿,上柱分离,此时可先用已烷洗脱以除去脂类和蜡。

文献[32]曾报道使用不同溶剂,对香豆素或呋喃香豆素的提取量做了分析比较,可供参考。

二、分离和纯化

(一) 经典分离法

1. 内酯分离

内酯分离(lactone separation)是早期分离香豆素的一个常用方法。通过香豆素的内酯环在碱性条件下,水解开环,然后用乙醚提取除去其他成分后,再酸化闭环使香豆素沉出。此法简单易行,缺点是某些结构的香豆素可阻碍内酯环的恢复或闭环时会发生异构化。

2. 分步结晶

分步结晶(fractional crystallization)可单独使用,也可结合分步沉淀(fractional precipitation)进行。由于大多氧代香豆素在石油醚中的低溶解度,因此在香豆素的乙醚萃取液中,逐步加入石油醚,可使不同溶解度的香豆素分步沉出。

3. 真空升华和水蒸气蒸馏

对于耐热的香豆素,高真空升华是一种简便的纯化方法,但需要注意加热有可能会诱导某些分子重排或降解。例如,受热可导致分子中的异戊烯氧基长链失去而形成酚羟基。水蒸气蒸馏也曾被用来分离某些不稳定、易分解的香豆素,如花椒内酯的分离。

(二) 色谱分离法

色谱是目前最普遍而有效的分离和纯化手段,其中以柱色谱和薄层色谱用得最多,几种色谱手段的配合或反复使用,往往能取得分离和纯化的较好效果。

1. 吸附剂的选择

由于香豆素结构易变,故对柱色谱的几种常用吸附剂应有所选择。

1) 碱性氧化铝常会使香豆素分子发生降解,必须慎用。一般酸洗过的氧化铝和中性氧化铝分离效果较好,但酸性氧化铝对羟基香豆素吸附力很强,有时难以洗脱。

2) 硅胶是目前使用最普遍的吸附剂,常用的混合洗脱剂有己烷-乙醚、己烷-EtOAc、石油醚-EtOAc、石油醚-Me_2CO 等。应注意硅胶的酸性可使某些具有邻二醇基侧链的香豆素产生频哪醇-频哪酮(pinacol-pinacolone)重排,从而形成次生

产物。

3) 其他柱色谱吸附剂还有聚酰胺、活性炭、十八烷化硅胶、Sephadex LH-20以及大孔树脂等。它们也常与硅胶柱配合使用, Sephadex LH-20 作为分子排阻色谱,常用于最终产物的纯化。例如,原先难以分离的蟛蜞菊内酯和去甲蟛蜞菊内酯即利用 Sephadex LH-20 才分离成功。

2. 不同色谱方法的配合使用

近年使用不同压力下的制备性液相色谱如快速色谱、LPLC、MPLC 和 HPLC 等,对结构相近的香豆素的分离和纯化起了很大作用。分析型 HPLC 是发现微量香豆素的一个极为有效的手段。近年发展的毛细管电泳法也已用于香豆素的分析[33]。

香豆素薄层色谱(TLC)中常用的展开剂有 EtOAc-己烷、EtOAc-$CHCl_3$ 等,其斑点可在 UV 下观察荧光。P-TLC 常用于对已部分分离的香豆素做进一步分离。

第五节 波谱鉴定

一、紫外光谱

香豆素母核的紫外光谱主要有 2 个吸收带,λ_{max}(lgε)274nm(4.03) 为苯环吸收;311nm(3.72) 为吡喃酮环吸收,而且很容易与色酮(chromone)相区别。色酮的λ_{max}一般在 240~250nm(lgε3.8)呈强吸收,而香豆素在这一区域却吸收最弱。

(一) 简单香豆素

1. 烷基取代

一般甲基引入对香豆素吸收波长的位移影响很小,但不同取代位置仍有差别。例如,3-Me 可使吡喃酮环吸收稍蓝移,而 5-、7-、8-Me 取代则使苯环吸收稍红移。长链烷基取代对吸收无明显影响。

2. 氧代基团

7-OH、7-OMe、7-β-D-glucosyloxy 三者的紫外光谱相似,即λ_{max}在~217nm 和315~330nm 处有强吸收,而在 240nm 和 255nm 处出现肩峰或弱峰。5,7-和 7,8-二 *O* 取代的吸收与 7-*O* 取代类似;6,7-二 *O* 取代则在~230nm 和 340~350nm 呈两个最大吸收。5,6,7-三 *O* 取代在 325~330nm 呈最大吸收,6,7,8-三 *O* 取代则在335~350nm呈最大吸收。

3. 诊断试剂

4-、5-或 7-羟基香豆素成盐后,其酚氧离子可与吡喃酮的羰基形成电子离域,故在碱性介质中,其 UV 谱的最大吸收 λ_{max} (lgε)将明显红移,且强度增加。例如,7-羟基香豆素成盐后,其长波带可从 325nm(4. 15)移至 372nm(4. 37),而 6-和 8-羟基香豆素在碱性中虽也红移,但强度下降。

如果碱性试剂改用乙酸钠,由于乙酸钠为弱碱,只能使酸性较强的羟基如 5-OH、7-OH 离子化。例如,7-羟基-6-甲氧基香豆素的 λ_{max} 可从 344nm 移至 391nm,且强度增加,而 6-羟基-7-甲氧基香豆素的吸收则从 347nm 仅移至 350nm,几乎不变,且强度明显下降。

氯化铝试剂可与邻二羟基香豆素络合而形成程度不等的红移。例如 7,8-二羟基香豆素即瑞香内酯仅红移 7nm,而 6,7-二羟基香豆素即七叶内酯可红移达 28nm,从而可与 5,7-二羟基香豆素相区别。

(二) 呋喃香豆素

线形呋喃香豆素补骨脂内酯的紫外光谱可显示 4 个吸收区:λ_{max} (lgε)为 205~225nm(4. 0),240~ 255nm(4. 06~ 4. 45),260~ 270nm(4. 18~ 4. 26)和 298~316nm(3. 85~ 4. 13),其特征吸收 242~ 245nm 和 260~ 270nm 在角形中就不存在。

补骨脂内酯的 C-5 或 C-8 单氧取代物,彼此也可经 UV 区别,前者在~ 268nm 的吸收峰,后者就不存在;前者在 310nm 的吸收,后者则出现在~ 300nm。

二、红外光谱

1. C—H 伸缩振动

在呋喃香豆素的 3025~ 3175cm^{-1} 区内,可见 2 个或 3 个弱至中等强度的吸收带,可归属于吡喃酮、苯、呋喃环的 C—H 伸缩振动。

2. C═O 伸缩振动

1) 香豆素的 C═O 伸缩振动一般在 1700~ 1750cm^{-1},色酮则在~ 1650cm^{-1},可据此加以区分。7-O 或 6-O 香豆素苷的 C═O 吸收一般低于 1700cm^{-1}。

2) 补骨脂内酯的 C-5 连有 OR,其 C═O 吸收(石蜡糊中)高于 1720cm^{-1},如果 C-8 连有 OR,则低于 1720cm^{-1}。

3) 吡喃香豆素的 C═O 在 1717~ 1730cm^{-1} 显示一强吸收带,而二氢吡喃香豆素则移至 1735~ 1750cm^{-1}。

4) 吡喃酮 C ═O 的伸缩振动可因形成分子内氢键而移动,如 3–芳基香豆素在芳基的 C–2′ 上存在游离 OH 可与 C ═O 形成内氢键,而使 C ═O 吸收处在 1600~ 1680cm^{-1} 。双香豆素 dicoumarol 的 C ═O 处于 1660cm^{-1} 也可归因于分子的两半之间存在较强的分子内氢键。

3. C ═C 骨架振动

香豆素一般在 1600~ 1660cm^{-1} 区域内有 3 个强吸收带,而色酮的吸收一般简单得多。

呋喃香豆素除有~ 1500cm^{-1} 和~ 1600cm^{-1} 的芳环吸收带外,在 1613~ 1639cm^{-1} 区内的一个强而尖锐的吸收可归因于呋喃环的 C ═C 伸缩振动。

4. 其他吸收

呋喃香豆素在 1088~ 1109cm^{-1} 和 1253~ 1274cm^{-1} 区内的 2 个吸收带是呋喃环的特征 C—O 伸缩振动,而在 740~ 760cm^{-1} 和 870~ 885cm^{-1} 区内的带则分别归于呋喃 C—H 键的面内和面外的弯曲振动。

三、核磁共振谱

(一) ^{1}H–NMR

1. 环上质子

(1) H–3 和 H–4 的化学位移(δ)和偶合常数(*J*)

1) 在 $CDCl_3$ 中的 δ 6. 1~ 6. 4ppm 和 δ 7. 5~ 8. 3ppm 的一对 d 峰, *J* = 9. 5Hz,分别提示为吡喃酮环上的 H–3 和 H–4。如果溶剂为 DMSO–d_6 ,则 H–3 和 H–4 的 δ分别为 7. 8~ 8. 1ppm 和 8. 1~ 8. 3ppm。与其他芳 H 的 δ值相比,一般 H–3 处最高场,而 H–4 处最低场。

2) 香豆素的 C–7 氧代基团,可使 H–3 高场位移~ 0. 17ppm,如 C–5 氧代,虽也有类似效应,但较弱。

(2) H–5 、H–6 和 H–8 的化学位移(δ)和偶合常数(*J*)

对 7–*O* 代香豆素:

1) H–5 和 H–6 因邻位偶合,按理应为一对 d 峰,但由于 H–6 还与 H–8 存在间位偶合,加上两者的化学位移相近,信号往往重叠,故实际上一般 H–5 为 δ 7. 38 (1H)的 d 峰(*J* = 9Hz),处于较低场,而 H–6 和 H–8 为 δ6. 87ppm(2H)的 m 峰,处于较高场。苯环上的这 3 个芳 H 信号常处于 H–3(最高场)和 H–4(最低场)这一组 d 峰信号之间。

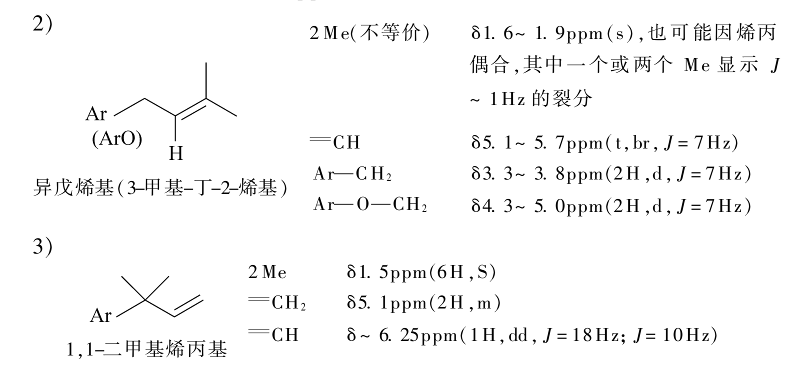
2) H–5 被氧代, H–6 与 H–8 可形成一对 J = 2Hz 的 d 峰。由于 H–6 与 H–8 的化学位移相近,一般单从 δ 值往往难以区分,但仔细观察,可看到 H–8 还与 H–4 存在着 J = 0.6~1.0Hz 的远程偶合。

3) 当 C–8 存在—R 或—OR 基,则 H–6 与 H–8 无间位偶合,可见 H–5 和 H–6 为一对 d 峰(J = 9.0Hz), H–5 处较低场(δ~7.3ppm), H–6 处较高场(δ~6.8ppm)。

2. 环上取代基

1) Ar—Me: δ2.45~2.75ppm

Ar—OMe: δ3.8~4.4ppm



3. 呋喃香豆素和吡喃香豆素

未取代的呋喃环容易通过 H–2′ 和 H–3′ 的一对烯质子的 d 峰(J~2.5Hz)来识别,一般 H–2′ 的 δ 为 7.5~7.7ppm; H–3′ 的 δ 为~6.7ppm(线形)或~7.0ppm(角形)。

吡喃环中 C–2′ 上的两个同碳 Me 形成一个 δ~1.45ppm 的 6H 单峰, C–3′ 和 C–4′ 上的两个烯质子呈一对 d 峰, J = 10Hz, H–3′ 中心为 δ5.3~5.8ppm; H–4′ 中心为 δ6.3~6.9ppm。

线形二氢呋喃香豆素中的 3′–H 和线形二氢吡喃香豆素中的 4′–H 均属苄基质子,它们均能与 H–5 存在 ^4J 的远程偶合。通过 ^4J 远程去偶可被利用对某些香豆素的结构鉴定。

NOE 对苯环四取代的香豆素的结构鉴定特别有用。例如,利用 NOE 确定枸橘内酯中 OMe 所在位置。当照射 δ3.82 的 OMe 使之饱和后,可见吡喃酮环上的 H–4 和吡喃环上的 H–4′ 的信号强度分别增加 9% 和 13%,表明 OMe 必靠近 H–4 和 H–4′ 而应位于 C–5,同时进一步证明吡喃环为线形稠合。

枸橘内酯

(二) ^{13}C-NMR

1. 香豆素母核的^{13}C-NMR 及其一般取代效应

香豆素分子骨架共有 9 个碳原子,均为 sp^2 杂化,其^{13}C-NMR 的化学位移在 100~160ppm 区域内,其中 C-2 和 C-9 偏在低场(表 14-1)。

表 14-1 香豆素母核各碳的 δ 值($CDCl_3$)[1,34]

C	2	3	4	5	6	7	8	9	10
δ/ppm	160.4	116.4	143.6	128.1	124.4	131.8	116.4	153.9	118.8

对大多数香豆素,羰基碳(C-2)的 δ 值几乎相同,都在 160ppm 左右。当苯环 H 被 OH 或 OMe 取代后,新形成的季碳信号将向低场位移约 30ppm,而其邻位和对位碳信号则高场位移分别为~13ppm 和~8ppm,间位碳一般影响较小,特别是 Me 和 COOH 取代,间位影响几乎可忽略。以 7-羟基香豆素为例见表 14-2。

表 14-2 7-羟基香豆素各碳的 δ 值(DMSO)[35]

C	2	3	4	5	6	7	8	9	10
δ/ppm	160.7	111.5	144.3	129.6	113.3	161.6	102.5	155.7	111.5

将 7-OH 香豆素的碳谱与香豆素母核相比,可见 7-OH 的邻、对和间位的 Δδ 基本符合上述的一般规律。

2. 呋喃香豆素和吡喃香豆素的^{13}C-NMR

以补骨脂内酯和邪蒿内酯的碳谱数据为例,线形与角形的差别主要可见于C-6 和 C-8 的变化,据此不难加以鉴别(表 14-3 和表 14-4)。

(三) 2D-NMR

2D-NMR 目前已广泛被应用于鉴定某些结构较复杂的或新颖结构的香豆素。

表 14-3　补骨脂内酯(线形呋喃香豆素)各碳的 δ 值[36]

C	2	3	4	5	6	7
δ/ppm	161.1	114.7	144.2	120.0	125.0	156.6
C	8	9	10	2′	3′	
δ/ppm	99.6	152.2	115.6	147.0	106.6	

表 14-4　邪蒿内酯(角形吡喃香豆素)各碳的 δ 值[37,35]

C	2	3	4	5	6	7
δ/ppm	160.4	112.2	143.5	127.5	114.6	155.9
C	8	9	10	2′	3′	4′
δ/ppm	108.8	149.8	112.2	77.2	130.4	113.1

例如,从中药白花前胡(*Peucedanum praeruptorum* Dunn)[38]以及最近从刺异叶花椒(*Zanthoxylum dimorphophyllum* Hemsl. *var. spinifolium* Rehd. *et* Wils)[39]和云南羌活[*Pleurospermum rivulorum* (Diels)]中[40]分离得到的新香豆素,其结构都是通过 2D-NMR 来完成的。

四、质谱

(一) 简单香豆素

1) 香豆素母核经 EI-MS 可得一强分子离子峰,随后失去 CO 成为苯骈呋喃离子的基峰,因此吡喃酮环失羰基已成为大多香豆素的质谱特征。反应如下

m/z 146 (76%) $\xrightarrow[*]{-CO}$ m/z 118 (100%) $\xrightarrow[*]{-CO}$ $[C_7H_6]^{+\cdot}$ m/z 90 (43%) $\xrightarrow{-H\cdot}$ $[C_7H_5]^{+}$ m/z 89 (35%)

2) 7-羟基香豆素的裂解方式基本上与香豆素母核类似,仅多了失 CO 的碎片。反应如下

−CO → m/z 106 (11%) −CO → m/z 78 (32%)

HO ... −CO * → HO ...

m/z 162 (80%) m/z 134 (100%) −CHO → m/z 105 (25%)

7–甲氧基香豆素则以分子离子峰为基峰,经失去 CO 和 CH_3 游离基后,形成的共轭氧祛离子(oxonium ion, *m/z*133)可因醌式结构而稳定化。反应如下

MeO ... −CO * → MeO ... $-\dot{C}H_3$ * → O ...

m/z 176 (100%) m/z 148 (82%) m/z 133 (83%)

(二) 呋喃香豆素和吡喃香豆素

1) 呋喃香豆素中呋喃环的存在不会改变简单香豆素的基本裂解过程,即仍然容易从吡喃酮中失去 CO,但对甲氧基呋喃香豆素如花椒毒内酯则首先是失去一个甲基游离基形成一个共轭的氧祛离子,随后再失去 CO。

OMe $-\dot{C}H_3$ * → −CO * →

m/z 216 (100%) m/z 201 (22%) m/z 173 (56%)

2) 在吡喃香豆素如邪蒿内酯质谱中,则主要是失去吡喃环上的一个甲基游离基,形成一个稳定的苯骈吡喃祛离子(benzopyrylium ion),并通常成为基峰。

$-\dot{C}H_3$ * → −CO * →

m/z 228 (15%) m/z 213 (100%) m/z 185 (19%)

第六节 研究实例

【例 14-1】 瑞香狼毒中新双香豆素的分离和结构鉴定[29]

瑞香科(Thymelaeaceae)植物瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)其根可用以治疗疥癣、顽固性皮肤溃疡、恶性肿瘤、慢性支气管炎和结核病等。从其根的乙醇浸膏的石油醚和乙醚部位中分得一个新的双香豆素(**1**),定名为 bicoumastechamin。

(1) 提取分离

植物干燥根(20kg)粉碎后,用 95% EtOH 提取,部分提取液浓缩后,相继用石

油醚和乙醚进行分配萃取，得乙醚提取物(1750g)。该提取物经硅胶柱色谱，用己烷-丙酮混合物进行极性递增梯度洗脱，收集己烷-丙酮(1∶2)流分，蒸去溶剂后，进一步以 RP-8 柱色谱分离，40% EtOH 洗脱，得化合物 **1**(9mg)。

(2) 结构鉴定

化合物 **1** 为黄色正方形结晶，熔点 264~265℃，分子式为 $C_{19}H_{12}O_6$ (HRMS, *m/z* 为$[M]^+$ 336.0612，计算值为 336.0633)，^{13}C-NMR(DMSO-d_6)显示 19 个碳信号。IR ν_{max}^{KBr} 为 3420cm^{-1}(OH)、1725cm^{-1}(C=O，内酯)、1600cm^{-1}、1500cm^{-1}(苄基)；UV λ_{max}^{MeOH} (lgε)为 212nm(4.44)、257nm(w)、325nm(4.37)，提示为 7-氧代香豆素的特征。^{1}H-NMR(DMSO-d_6)显示 1 个 OMe (δ3.79ppm)、8 个芳 H(δ6.24~8.05ppm)和 1 个 OH(δ10.62ppm)信号。有两对典型的 H-3 和 H-4 信号，一对为 δ6.26ppm(1H, d, J = 9.5Hz, H-3)和 δ8.04ppm(1H, d, J = 9.5Hz, H-4)，另一对为 δ6.24ppm(1H, d. J = 9.7Hz, H-3′)和 δ7.93ppm(1H, d, J = 9.7Hz, H-4′)，表明分子由两个 C-3 和 C-4 未被取代的香豆素部分组成，符合从分子式算得的不饱和数 14。此外，两个相关的质子 δ7.75ppm(1H, d, J = 8.7Hz, H-5)和 δ7.18ppm(1H, d, J = 8.8Hz, H-6)和两个单峰信号 δ6,89ppm(1H, s, H-8′)和 δ7.46ppm(1H, s, H-5′)的归属，连同两部分香豆素的连接位置由 NOESY 实验确定。在 NOESY 谱中，可见 H-4′(δ7.93ppm)和 H-5′(δ7.46ppm)、H-8′(δ6.89ppm)和 OH (δ10.62ppm)、H-4 (δ8.04ppm)和 H-5 (δ7.75ppm)以及 H-6 (δ7.18ppm)和 7-OMe(δ3.79ppm)这几对信号之间的 NOE 效应。据此，表明两个香豆素部分是经 C-8 与 C-6′ 相连。**1** 的结构经 EI-MS 裂解碎片(图 14-1)和 ^{13}C-NMR 进一步加以确证。

图 14-1　bicoumastechamin **1** 的结构及其 MS 裂解碎片

参 考 文 献

[1] Robert D H et al. The Natural Coumarins, Occurrence, Chemistry and Biochemistry. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1982, 13, 12, 55, 131
[2] 徐任生, 叶阳, 赵维民. 天然产物化学 (第二版). 北京: 科学出版社, 2004,589
[3] Murray R D H. Nat Prod Rep, 1995, 12:477
[4] Ana Estevez-Braun et al. Nat Prod Rep, 1997, 14:465
[5] Kojima K et al. Chem Pharm Bull, 2000, 48(3):353
[6] Quadri-Spinelli T et al. Planta Med, 2000, 66:728
[7] Ishii H et al. Chem Pharm Bull, 1991, 39(11):3100
[8] Paknikar S K et al. J Indian Inst Sci, 1994, 74:277
[9] Lin G Q et al. Tetrahedron Lett, 1996, 37(17):3015
[10] 徐嵩等.药学学报, 2000, 35(2):103
[11] Nofal Z M et al. Molecules, 2000, 5:99
[12] Tawnya C. Mckee et al. J Nat Prod, 1996, 59:754
[13] 孔令义等. 天然产物研究与开发, 1994, 6(1):50
[14] Kang T H et al. Planta Med, 1999, 65:400
[15] Kim N Y et al. Planta Med, 1999, 65:656
[16] Wang C C et al. Bioorg Med Chem, 2000, 8:2701
[17] Nishimura S et al. Chem Pharm Bull, 2000, 48(4):505
[18] Ojala T et al. Planta Med, 1999, 65:715
[19] 孔令义等. 药学学报, 1993, 28(6):432
[20] 孔令义等. 药学学报, 1993, 28(10):772
[21] 孔令义等. 药学学报, 1994, 29(1):49
[22] 黄平等. 药学学报, 1997, 32(1):62
[23] 王洪新等. 药学学报, 1995, 30(11):812
[24] 张金生等. 药学学报, 2001, 36(1):34
[25] Tawnya C Mckee et al. J Nat Prod, 1998, 61:1252
[26] Matthee G et al. Planta Med, 1999, 65:493
[27] Kucherenko A et al. Tetrahetron Lett, 1995, 36(31):5473
[28] Prashant P et al. J Org Chem, 1995, 60:2964
[29] Xu ZH et al. J Asia Nat Prod Res, 2001, 3:335
[30] Cai J N et al. J Nat Prod, 2000, 63:485
[31] Takadate A et al. Chem Pharm Bull, 2000, 48(2):256
[32] Bourgaud F et al. Phytochemical Analysis, 1994, 5:127
[33] Tegtmeier M et al. Pharmazie, 2000, 55(2):94
[34] 季小慎等. 波谱学杂志, 1997, 14(2):185
[35] 龚运淮等. 天然有机化合物的 ^{13}C 核磁共振谱的研究. 昆明:云南科技出版社, 1986, 189

[36] Macias F A et al. Magn Reson Chem, 1989, 27:705
[37] Macias F A et al. Magn Reson Chem, 1990, 28:732
[38] 孔令义等. 波谱学杂志, 1994, 11(3):245
[39] 陶朝阳等. 药学学报, 2001, 36(7):511
[40] 肖永庆等. 药学学报, 2001, 36(7):519

第十五章　木脂体类化合物[1,2]

第一节　概　　述

木脂体类(lignans)是一类由苯丙素氧化聚合而成的天然产物,通常所指的是二聚体,少数为三聚体和四聚体等。1961 年,Freudenberg 等把苯丙素 $C_6 \sim C_3$ 单元编号为 1~ 9,第二个 $C_6 \sim C_3$ 单元编号为 1′~ 9′。最早木脂体素是指 8-8′连接的二聚体[3] (**1**)。后来发现,许多木脂体类并非 8-8′相连,Gottieb 把 8-8′以外连接的木脂体类称为新木脂体类(neolignans,**2**)[4] ,后来又把两个 $C_6 \sim C_3$ 单元之间以氧原子连接的化合物称为氧木脂体类(oxyneolignans,**3**)。

1　　**2**　　**3**

木脂体类的苯丙素组成单元也可分成多种类型,主要包括肉桂醇(cinnamyl alcohol)、肉桂酸(cinnamic acid)、丙烯基酚(propenyl phenol)、烯丙基酚(allyl phenol)等。木脂体类两个苯环上常有氧取代基,并以 C_4、C_3、C_4 或 C_3、C_4、C_5 取代较多。侧链上含氧官能团也多有变化,尤其是侧链末端碳(又称 γ-或 9-位)原子上的含氧官能团,如羟基、羰基、羧基等,这些含氧基团相互脱水缩合,又出现四氢呋喃、半缩醛、内酯等环状结构。这就使木脂体类的结构类型繁多。

一、木脂体类化合物的命名

以往木脂体类化合物多数用俗名或以半系统命名,随着对木脂体研究兴趣的增长和化合物数目的大量增加,出现了不同文献有不同命名的情况,如以下 3 个骨架就有多种命名:

7,7′-epoxylignane
2,5-diaryltetrahydrofuran
7. 0. 7′,8,8′-lignan

2,5-diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran
2,7′-cyclolignane
4-aryl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene cyclolignane
8.8′,7.2′-lignan

1-aryltetralin
8,4′-oxyneolignane
8,0,4′-lignan
(8-0-4′)-neolignan

为了解决这个混乱情况,美国化学文摘(CA)应用自己的系统命名法希望补救这一问题,但有时却把问题弄得更为复杂。为此,国际纯和应用化学会(IUPAC)在1976年和1999年提出天然产物命名建议后,于2000年再一次提出木脂体和新木脂体命名建议[5]。这一命名建议的基本内容是以 C_6 ~ C_3 为单元,其中苯环部分与丙基相连的碳编号为1,苯环编号为1~6,而丙基部分,以与苯环相连的碳编号为7,依次为7~9。第二个 C_6 ~ C_3 单元的编号上加"′"。如果两个 C_6 ~ C_3 单元是以8-8′相连,则称其为木脂体;如果不是8-8′相连,而是其他位置C—C相连,则称其为新木脂体。如果 C_6 ~ C_3 单元之间不是以C—C链相连,而是以醚键相连者,则称为氧木脂体。化学结构中别的附加环,取代变化和立体异构,仍以标准的有机化学命名法。含氧基团的位置,双分子连接的桥头碳编号,均用最小可能数。下面举一些具体的命名实例[6]:

7,9′,7′,9-diepoxylignane

4,4′,9′-trihydroxy-3,3′,5,5′-tetramethoxy-2,7′-cyclolign-7-en-9-oic acid

3′,5′-dimethoxy-3,4-methyl-enedioxy-2′,7′-epoxy-4′H-8,1′-neolign-8′-en-4′-one

rac-(8α,8′α)-3,3′-dimethoxy-4,5,4′,5′-*bis*(methylene-dioxy)-2,2′-cyclolignane

在文献查阅时要注意 IUPAC 命名系统和 CA 命名系统的差别,可以利用 CA 的 Index Guide 检索,如鬼臼毒素的化学命名如下:

(7α,7′α,8α,8′β)-7-hydroxy-3′,4,′,5′-trimethoxy-4,5-methylenedioxy-2,7′-cyclolignano-9′,9-lactone

(IUPAC 系统命名)

furo[3′,4′=6,7]naphtho[2,3-d]-1,3-dioxol-6-(5αH)-one, 5,8,8a,9-tetrahydro-9-hydroxy-5-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-,(5*R*,5a*R*,8a*R*,9*R*)-

(CA 系统命名)

二、木脂体的生物合成

很久以前,一些学者就推测木脂体和木质素可能是由松柏醇(coniferyl alcohol)经过氧化,游离基聚合而生成的。并用 *Forsythia suspensa* 中获得的去细胞酶制品证明可将阿魏酸(ferulic acid)还原为松柏醇,此酶的活化需要镁离子的参与,还原过程经过烯丙基边链的磷酸化。松柏醇会进一步在酚氧化酶的作用下形成酚游离基。根据共振式形成机制,可以形成多种游离基,游离基偶合后形成结构千变万化的木脂体和木质素。

松柏醇游离基的共振结构

在 *Forsythia* 中已证实(+)-pinoresinol 是两分子松柏醇通过立体选择性的偶联而成的,氧化剂和氧化酶参与了这一过程。接着可以在还原酶的作用下,顺序选择性还原成(+)-lariciresinol,(-)-secoisolariciresinol。这个过程中的还原性辅酶Ⅱ(NADPH)也已被纯化,它们具有相同的动力学参数和相对分子质量。这个立体选择性过程中,pinoresinol 的 C-2、C-5 构型转化,可能涉及 S_N2 机制或通过一

个醌式中间体的还原。最终通过选择性脱氢得(－)–matairesinol,而后者是形成其他类别木脂体的重要生物合成分支点,如鬼臼毒素(podophyllotoxin)系列的生物合成[7]。

NADPH

(+)-pinoresinol

(+)-lariciresinol

NADPH

NADP+

(−)-secoisolariciresinol

(−)-matairesinol

也可用如图 15－1 所示的生物合成途径表达。

这是在椿叶花椒(*Zanthoxylum ailanthoides*)中研究(＋)–lariciresinol(**6**)的生物合成[8],而在牛蒡子苷元(arctigenin)的生物合成途径中,(＋)–lariciresinol 作为中间体。反应如图 15－2 所示。

6 是咖啡醇(**4**)经过(＋)–pinoresinol(**5**)中一个苄醚键开裂而形成的。从椿叶花椒无细胞提取物能够将 pinoresinol 转变成 lariciresinol,可以证明 NADPH 的存在。

三、木脂体的分离与鉴定

近 20 年来,木脂体类化合物的研究有了长足的进展,原因在于一些重要生物活性化合物的发现和对这类复杂结构的兴趣。许多新技术、新方法的应用更加快

MeO, O•, CH_2OH; MeO, O, CH_2OH; 二聚; OH, OMe; $H^{\oplus}$; O; OMe; MeO; CH_2OH; CH_2OH; HO; OH; O; OMe; OMe; OH; O; $H^{\oplus}$; (+)-pinoresinol; [H]; OH, OMe; MeO; CH_2OH; a; HO; CH_2OH; HO; CH_2OH; b; [H]; b; NAD^+; OMe; OMe; O; a; O; $H^{\oplus}$; $H^{\oplus}$; b; a; OH, OMe; H; MeO; CH_2OH; O; HO; O; CH_2OH; CH_2OH; HO; H; O; HO; MeO; OMe; OMe; OMe; OH; OH; OH

(+)-lariciresinol　(−)-matairesinol　(+)-isolariciresinol

图 15－1　鬼臼毒素系列的生物合成途径

4　5　6

7　8　牛蒡子苷元

图 15-2　牛蒡子苷元的生物合成

了这一领域的研究进展。

从化学结构类型来看,木脂体并不是一类物质,具有 10 多种母核结构,缺乏共同的特征反应。在提取分离过程中,主要存在于脂溶性部分,多数可用硅胶色谱分离。如果含酚羟基,则与酚性成分的分离方法类似。在薄层色谱上,可用 5%磷钼酸乙醇液、30%硫酸乙醇液等,喷洒后于 100℃加热数分钟,各类木脂体可显示不同的颜色,并可依此初步推断其结构类别。超临界提取已在木脂体的分离中得到有效的应用[9]。

木脂体的定性定量方法,主要采用正相或反相的 HPLC。与电喷雾质谱(ESI-MS)或快原子轰击质谱(FAB-MS)联用,可以提供一种快速的分析方法。例如,不经分离直接分析亚麻仁提取物中的 secoisolariciresinol 及其苷类[10]、分析人血浆中的五味子素(schizandrin)含量[11]。

1. 紫外光谱

多数木脂体类化合物借助于波谱方法就能确定其化学结构,包括其立体结构。其中紫外光谱主要测定苯环的存在状态。多数木脂体的两个取代芳环是两个孤立的发色团,其 UV 吸收峰位置相似,吸收强度是二者的总和。木脂体一般呈现酚衍生物的吸收,如二芳基丁烷类、苯并呋喃类等在 230nm ($\lg\varepsilon > 4.0$)、280nm ($\lg\varepsilon$ 3.5) 附近有吸收峰。当边链上有双键并与苯环共轭,则呈现肉桂酸酯衍生物的吸收特征,在 235nm、295nm、335nm 附近有峰,如二芳基丁内酯类。当边链连接成一个苯环,如芳基萘类,则呈现萘衍生物的吸收特征。在 220nm、260nm、295nm、

310nm、350nm 附近有多个吸收峰，鉴别比较容易。如果为苯并呋喃环，则在 320nm 附近有吸收峰。如果为联苯环辛烯类，则呈现氧取代联苯的吸收特征，在 220nm、250nm、285nm 附近有多个吸收峰，部分峰可以肩峰形式出现，其最大吸收在 220nm 左右的位置与联苯的夹角有关。

以下以鬼臼毒素衍生物为例，说明紫外光谱所反映的结构信息。天然的鬼臼毒素(**9**)、去氧鬼臼毒素(**10**)、鬼臼毒素苷(**11**)，它们的紫外吸收 290～294nm(ε为 4400～4800)是结构中两个发色团[亚甲二氧基苯，283nm (ε为 3300)和三甲氧基苯，270nm (ε为 650)]的加和。峰位稍红移是由于苯环上的烷基取代，就像黄樟醚(safrole，**14**)，λ_{max}为 286nm，比亚甲二氧基苯红移一些一样。α-盾叶鬼臼素(α-peltatin，**12**)和β-盾叶鬼臼素(**13**)是鬼臼毒素 7-OH 移至 6-位，它们的紫外吸收比后者紫移一些。就像 *myristicin*(**15**)比黄樟醚紫移一样。

	OH	λ_{max}(lgε)
9	OH	292nm(3.65)
10	H	293.5nm(3.68)
11	O—glc	291nm(3.62)

	R	λ_{max}(lgε)
12	H	274nm(3.41)
13	Me	273nm(3.26)

14

15

关于紫外光谱可以判别共轭系统的状态，也可以从下面实例加以说明，如α-、β-、γ-失水苦鬼臼脂素(apopicropodophyllin，**16**，**17**，**18**)，去氢鬼臼毒素(**19**)。其中β-

λ_{max} 311 nm (lgε 3.88)

16

λ_{max} 290 nm (lgε 3.66)

17

λ_{max} 350 nm (lgε 4.10)

18

λ_{max} 323 nm (lgε 4.02)
λ_{max} 356 nm (lgε 3.72)

19

失水物的双键和两个苯环均不共轭,紫外吸收峰与鬼臼毒素相似。α-失水物由于共轭系统延长,吸收峰红移。γ-失水物使苯环与羰基共轭,吸收峰更红移。去氢鬼臼素芳香化成连苯基的萘环,吸收特征与萘衍生物相似。

2. 红外光谱

木脂体的红外光谱,除了多数在 1500~ 1600cm^{-1} 显示芳环吸收之外,1760~ 1780cm^{-1} 的孤立五元内酯,1740~ 1760cm^{-1} 的共轭五元内酯,1725cm^{-1} 不饱和五元内酯,1625cm^{-1} 的边链双键,1670cm^{-1} 的酮基,1640cm^{-1} 的双烯酮吸收峰对判断结构均具有一定意义。

3. 核磁共振谱

氢核磁共振谱、碳核磁共振谱以及它们的二维谱技术是测定木脂体类化合物的主要依据,我们将在以下各类化合物的实例中给予介绍。不少作者曾试图将各类木脂体的核磁共振谱进行归纳,但由于结构变化大,影响因素多,而使实际应用受到很大限制。相对来说,碳谱的归纳对各类木脂体的骨架和边链取代情况的判断可能更有一些参考价值[12]。

第二节　木脂体的结构类型及其性质

一、二芳基丁烷类

二芳基丁烷类(dibenzylbutanes)是一类 8-8′ 相连、最简单的木脂体类成分,其 C_3 部分可进一步氧化成醇基、羰基、羧基或脱水成烯基,所以本类型把二芳基丁烯、二芳基丁醇、二芳基丁酸也包括在内。例如,从蒺藜科植物 *Larrea divaricata* 中得到的去甲二氢愈创木脂酸(nordihydro guaiaretic acid,**20**)为分子对称的内消旋化合物,可作油脂和其他食品的抗氧剂,而从珠子草(*phyllanthus niruri*)中分离得到的叶下珠脂素(phyllanthin,**21**)[13],红花五味子(*Schisandra rubriflora*)得

到的化合物 **22**[14] 都为二芳基丁二醇类(dibenzylbutanediols)。

20　　**21**　　**22**

在生物合成过程中,二芳基丁烷类常常是其他类型木脂体的生源前体。

也可通过化学方法转变成其他类型的木脂体,如化合物 **23** 经 DDQ 在 TFA 溶液中氧化生成化合物 **24**、**25** 和 **26**[15]。反应如下

DDQ / TFA (三氟乙酸)

23　　多 **24**　　+ 少 **25**　　+ **26**

二、二芳基丁内酯类

二芳基丁内酯类(dibenzylbutyrolactones)成分又称木脂体内酯(lignanolide),是木脂体 C-9 氧化成羧基与 C-9′ 羟基而成的γ-内酯化合物,如从罗汉松(*Podocarpus spicatus*)心材中得到的罗汉松脂素(matairesinol,**27**)。根据内酯环的不饱和程度又可有一些单去氢和双去氢的衍生物。

27

【例 15-1】 3,4,8-trihydroxy-3′,4′-dimethoxylignano-9,9′-lactone (**28**)

中美洲的荨麻科植物 *Phenax angustifolius*，民间作为杀虫药，叶子用 70% 乙醇冷浸，浸膏用正丁醇－水分配。正丁醇可溶部位用 Sephadex LH-20分离，甲醇洗脱，然后 C_{18} Bondapack 反相硅胶制备柱，甲醇－水(4∶6)洗脱得一油状物。$[\alpha]_D^{25}$ 为 -39.1°；EIMS 分子离子峰 *m/z* 为 374；从 600 MHz ^{1}H-NMR 谱脂肪族区域可见 2 个亚甲基、1 个接氧的亚甲基、2 个甲氧基，在芳香族区域有 6 个芳香质子，推测含 2 个芳环；^{13}C-NMR 可见存在一个内酯环(δ180.6ppm)和 12 个芳香碳原子。分析 2D-NMR 谱数据，归属 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 信号，用 ^{1}H-^{1}H-DQF-COSY 技术，证实 9′-H_2 与 8′-H、7′-H_2 之间偶合关系，并根据文献，推测 9′-H_2 为 2,3-反式γ-丁内酯的亚甲基[16]。

28

8′-C(δ77.4ppm)与具有丁内酯反式连接的 benchequiol 一致，而与顺式连接的 guayadequiol(δ75.9ppm)不同。

HMBC 谱可见 9′-H_2 (δ4.00ppm)与 7′-C(δ32.2ppm)、8′-C(δ44.6ppm)、8-C(δ77.4ppm)、9-C(δ180.6ppm)关联。7-H_2 (δ3.14ppm、δ2.98ppm)与 8′-C(δ44.6ppm)、8-C(δ77.4ppm)、9-C(δ180.6ppm)相关。

通过 HMQC 和 HMBC 谱归属了所有数据如下：

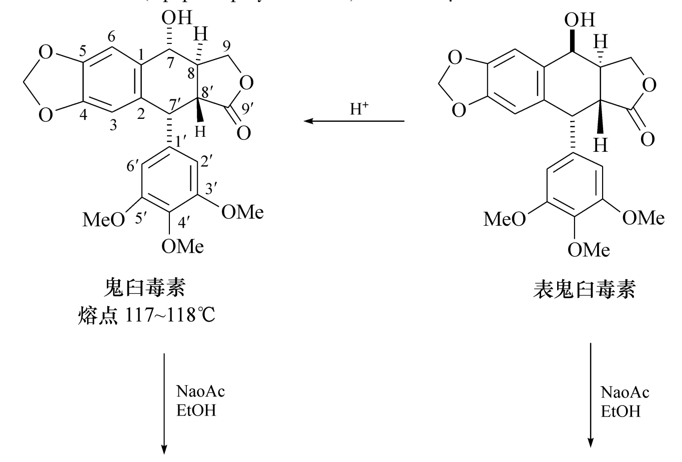
上述化合物原文献命名为 2-hydroxy-2-(3′,4′-dihydroxyphenyl) methyl 3-(3″,4″-dimethoxyphenyl) methyl-r-butyrolactone[17],这是从内酯环开始碳原子编号的命名方法。

三、芳基萘类

芳基萘类(arylnaphthalenes)包括芳基萘、芳基二氢萘、芳基四氢萘,又称环木脂体内酯(cyclolignolide),原因是结构中除了 C-7,8,C-7′,8′构成一个萘环之外,C-9,C-9′常常构成一个γ-内酯环。芳基萘类是木脂体中分布较广,化合物较多,研究也较多的一类。特别是对属于芳基四氢萘、具有抗肿瘤活性的鬼臼毒素(podophyllotoxin)及其衍生物的研究尤为深入。文献中常将内酯环羰基在上面的称为正式(normal),向下的称为反式(retro)。注意:以往鬼臼毒素(**29**)碳原子的编码与本文不一样。

正式内酯环　　反式内酯环　　**29**

鬼臼毒素遇碱后异构化为苦鬼臼毒素(picropodophyllotoxin),8,8′-反式转变成顺式。表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)遇酸后 7β-OH 变成 7α-OH。反应如下



鬼臼毒素
熔点 117~118℃

表鬼臼毒素

苦鬼臼毒素
熔点 160~161℃

表苦鬼臼毒素

叶下珠属植物也含有多种芳基萘类,包括带内酯环的酚苷类等,如从 *Phyllanthus myrtifolius* 分离得到的 Phyllamyricolide B(**30**)和 Phyllamyricin C(**31**)都属芳基萘类[18]。

30　　**31**

四、四氢呋喃类

四氢呋喃类(tetrahydrofurans)也是木脂体中比较丰富的一类,而且不断有新的化合物发现。根据氧环连接的方式,可分为 7-*O*-7′,7-*O*-9′和 9-*O*-9′三类四氢呋喃结构。四氢呋喃上可能存在 4 个手性碳,所以其立体化学研究也很有趣。

7-*O*-7′　　7-*O*-9′　　9-*O*-9′

furoguaiacin (**32**)是愈创木树脂中的一个成分,属 7-*O*-7′呋喃环连接,遇到氧化酶或碱液时,会生成醌式结构的愈创兰(guaiac blue,**33**)。

玄参科肉果草(*Lancea tibetica*)在藏医中用于治疗咳嗽和感冒,从其全草分离得到一种四氢呋喃类木脂体苷,命名为 tibeticoside(**34**)[19]。

32　　33

34

这类化合物遇酸不稳定，如 veraguensin(**35**)在 2%的过氯酸-乙酸溶液中，室温放置就会重排，脱水成苯基二氢萘木脂体(**36**)。

35　　36

五、双四氢呋喃类

双四氢呋喃类(2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octanes)又称双环氧木脂体(bisepoxylignan)基本结构中具有 4 个手性碳，但在天然产物中两个四氢呋喃环以顺式并合，因此立体异构体的最大可靠数只相当于 3 个手性碳。

7-和 7′-位的两个芳香取代基若同时与双四氢呋喃环处于反式平伏键构象的或顺式直立键构象，如(+)-芝麻脂素[(+)-sesamin，**37**]和 diasesartenin(**38**)，则称其为对称型。若 7-和 7′-位的取代基分别与环处于顺式和反式的，如(+)-细辛脂素[(+)-asarinin，**39**]和 sylvatesmin(**40**)，则称为非对称型。

37

38

39

40

由于苄醚易于开裂,重复闭环时容易发生异构化,所以该类化合物遇酸容易发生差向异构化,对称型化合物异构化成多种不对称型化合物,如(+)-芝麻脂素的异构化产物之一为(+)-细辛脂素,又如(+)-松脂素(**41**)用酸处理后,其主要产物为(+)-表松脂素(**42**),因此在分离过程中要注意酸的影响。该类化合物容易受硝酸氧化,将四氢呋喃环氧化成双内酯环。例如,(+)-松脂素经甲基化、溴化得到二溴甲基化物(**43**),再用硝酸氧化即得到双内酯化合物(**44**)[20]。

41 $\xrightarrow{H^+}$ 42

41 $\xrightarrow{1)\text{甲基化}\ 2)Br_2}$ 43 $\xrightarrow{HNO_3}$ 44 +

43

44

【例 15-2】 威灵仙中 clemaphenol(**45**)的结构测定[21]

威灵仙(*Clematis chinensis*)的干燥根和根茎,经 95%乙醇热回流提取,浸膏的乙酸乙酯可溶部分经硅胶柱色谱分离得到一木脂体化合物 clemaphenol A。高分辨质谱给出分子式 $C_{20}H_{22}O_6$,$[\alpha]_D^{25}$ 为 +72°($CHCl_3$)。IR:3400cm^{-1}(br,羟基),1460~1610cm^{-1}(芳环),860cm^{-1},830cm^{-1}(1,2,4-或 1,3,4-三取代苯)。从^{1}H-NMR 上可见到 δ5.6ppm(OH)、δ3.90ppm(—OCH_3)、δ3.10ppm(8,8′-H),δ4.74ppm(d,4.1)为 7,7′-H;δ3.87ppm(dd,8.8,3.3)和 δ4.26ppm(dd,8.8,6.6)分别为 9,9′的直立键和平伏键 H,这是一个四氢呋喃并四氢呋喃的结构。苯环连接在 7,7′-位,是一个对称型结构,假如为不对称型结构,则 9,9′-的 H 将是多重峰,而不是 dd 峰。芳香 H 只有 3 组峰,δ6.90ppm(d,1.1)、δ6.82ppm(dd,8.2,1.1)、δ6.89ppm(d,8.2),说明两个苯环取代相同,可能为 1,3,4-取代,δ3.90ppm(3H)为甲氧基,δ5.61ppm(br-)为羟基;再结合^{13}C-NMR 数据,推测该化合物可能为(+)-松脂素(**41**)或另一新结构命名为 clemaphenol A。

41　　**45**

余下的问题是推测—OH 和—OCH_3 的取代位置。根据经典的化学显色方法确定酚羟基的位置,将此化合物、阿魏酸和异阿魏酸同点于一块聚酰胺薄膜上,90%甲醇展开,Gibbs 试剂(2,6-dibromoquinonechloroimide)显色,如果酚羟基的对位有游离 H,则反应呈蓝色,而且不褪色。薄层的显色结果如下:该化合物和异阿魏酸斑点都呈湖蓝色,而且长久不褪色,而阿魏酸斑点呈深蓝色,在空气中蓝色褪去,且斑点中间变成黄色,由此推断化合物中苯的取代位置与异阿魏酸一致。

六、联苯环辛烯类

联苯环辛烯类(dibenzocyclooctenes)木脂体主要来源于五味子科植物,由于某些化合物具有重要的生物活性,如 steganacin 有抗白血病作用,五味子酯甲及其类似物具有保肝和降低血清转氨酶作用,因此这一领域研究曾经十分活跃。

该类化合物具有多个手性因素,其立体异构体较多,它们以联苯 *R*-和-*S* 构型分为两个系列,其联苯 *S* 的代表化合物 gomisin D 和联苯 R 的代表化合物 gomisin A 的结构和绝对构型均为 X 射线所确证。这类木脂体环辛烯的构象多数为扭曲的船⁻椅式(TBC),部分为扭曲的船式(TB)。

联苯*R*-　联苯*S*-　TBC　TB

联苯的绝对构型可由圆二色谱的 Cotton 效应符号推定。若在 250nm 左右出现负的 Cotton 效应,表明为 *S*-构型,而正的 Cotton 效应则表明为 *R*-构型。同时在 220nm 左右出现一个相反符号的 Cotton 效应加以佐证。关于比旋度,虽然多数联苯 *S*-型化合物为左旋,*R*-型化合物为右旋,但已有一些 *S*-构型的化合物具有右旋比旋度的报道,因此不能以比旋度符号决定绝对构型。

根据联苯的构型和环辛烯的结构,文献中又将此类木脂体以某一化合物为代表,分成若干系列,如 gomisin、kadsurin、schisantherin、kadsulignan、stegane(**46**)、schizandrin-wuweizisu、heteroclitin 等系列。

46

这类成分常常是一种成分多个名称。例如,isokadsuranin(**47**),又名 deoxygomisin O 或 gomisin N;deoxygomisin A(**48**),又名 γ-schizandrin 或 wu-

weizisu B。因此,要了解和正确使用化学命名,如(-)-steganone(**49**)的化学命名为(2*R*a)-(8β,8′α)-3,4,5-trimethoxy-4′,5′-methylenedioxy-7′-oxo-2,2′-cyclolignano-9,9′-lactone。

47 **48**

49

七、苯并呋喃类

苯并呋喃类(benzofurans)可归纳到新木脂体类内,其中一个 $C_6 \sim C_3$ 单位的 C_3 部分与苯环相连,并形成一个呋喃环。呋喃环及与呋喃环并合的苯环有时部分氢化,而存在二氢、四氢和六氢的衍生物。常存在于樟科和胡椒科植物中。

从海风藤(*piper futokadsura*)和山蒟(*P. hancei*)中分离得到的海风藤酮(kadsurenone,**50**)和山蒟素(hancinone,**51**)、kadsurin A(**52**)等具有强的抑制血小板活化因子(PAF)作用。

50　$R^1=R^2=Me$
51　$R^1=R^2=CH_2$
52

【例 15-3】　从西洋参(*Panax quinquefoliuins*)的茎叶中分离得到一种苯并呋喃类化合物西洋参 L_1(quinquenin L_1,**53**),它从正丁醇部分经大孔树脂柱色谱和反相硅胶色谱分离得到[22]。

化合物 **53** 为白色粉末,熔点 224~226℃,10%硫酸水解可检出 D-葡萄糖。^{1}H-NMR(C_5D_5N)谱给出 5 个芳香质子信号:δ 7.48ppm(1H, br, d, J=8.5)、δ 7.32ppm(1H, brs)、δ 7.20ppm(1H, d, J=8.5)、δ 7.04ppm(1H, brs)、δ 6.91ppm(1H, brs)。这说明结构可能存在 1,3,4-三取代和 1,3,4,5-四取代的 2 个苯环。此外,还有 2 个甲氧基信号 δ 3.67ppm 和 δ 3.59ppm,一组葡萄糖的信号 δ 5.66ppm(d, J=7.0),δ 4.0~4.8(6H);根据^{13}C-NMR 测得除芳碳和甲氧基之外的 6 个碳信号,即 δ 87.9ppm、δ64.4ppm、δ 62.3ppm、δ 56.2ppm、δ 36.1ppm、δ 32.7ppm,推测可能是一个木脂体化合物,而且可能存在呋喃环,查阅文献得知这是一个已在植物 *Larix leptolepis* 中分离得到过的化合物,可以命名为 3′,9,9′-hydroxy-3-methoxy-4′,7-epoxy-neolig-nane-4-*O*β-D-glucopyranoside(原文献命名为 2,3-dihydro-2-(4-*O*β-D-glucopyranosyl-3-methoxyphenyl)-3-hydromethyl-5-w-hydropropyl-7-hydrxy-benzofuran)。

53

八、双环辛烷类

木脂体的双环辛烷类[bicyclo(3,2,1) octanes]是指结构中有两个脂环,环上共有 8 个碳原子,它可以看成是木脂体结构中一个 C_6~C_3 单元的芳环被部分氢化了,而另一个 C_6~C_3 单元的 C_3 部分正是连接在这个被氢化的芳环上。目前发现的这类结构大多集中于胡椒属、*Ocotea* 属、*Aniba* 属等热带植物中。例如,从毛蒟(*Piper puberulum*)中分离得到的 Puberulin A(**54**)、C(**55**)[23]。

54

55

九、苯并二氧六环类

当苯环上 3,4-二羟基分别与另一个 $C_6\sim C_3$ 单元的侧链形成二氧六环后,就成为苯并二氧六环类(benzodioxanes)木脂体。例如,樟科植物 *Eusideroxylon zwageri* 中的 eusiderin A(**56**)、从美洲商陆(*Phytolacca americana*)种子分离得到的 americanol A(**57**)和 isoamericanol A(**58**)都是苯并二氧六环类[24],其中 eusiderin A 是这类结构的代表[25]。

56

57

58

十、联苯类

联苯类(biphenyl derivatives)木脂体是两分子苯丙素的两个苯环直接连接而成,多数 3,3′-位相连。厚朴酚(magnolol,**59**)从厚朴(*Magnolia officinalis*)树皮中获得,自日本厚朴(*M. obovata*)树皮中得到的和厚朴酚(honokiol,**60**)是其异构体。从 *Irvingia malayana* 木材中分得的化合物 **61** 和从甜菜中得到的化合物 **62** 则有更多含氧基团,UV 谱上也很有特征[26, 27]。

59　60

61　62

十一、低聚木脂体类

低聚木脂体类(oligomeric lignans)是指两个以上 C_6 ~ C_3 单元聚合而成的天然成分,包括倍半木脂体(sesquilignan)、二聚木脂体(dimeric lignan)、三聚木脂体(trilignan)等,近年来新低聚木脂体的发现明显增加,而且各种低聚木脂体常常在同一植物中共存。

从云南八角(*Illicium simonsii*)的树皮中分离得到的 simonsinol(**63**)[28],从野八角(*I. dunnianum*)的地上部分得到的化合物 **64**[29],从云南丹参(*Salvia yunnanensis*)根中获得的带有二环辛烷的化合物 **65**[30] 和从和黄连的根茎中分离得到的 cyclohexa-2,5-dienone(**66**)[31] 都属于倍半木脂体。

63　64

65　66

十二、其他类

除了上述各类木脂体类化合物之外,自然界还有一类两个 C_6 ~ C_3 连接发生较大变异,或者只有一个 C_6 ~ C_3 单元与其他天然成分相连的成分。本章把它们都归属于其他类,其中包括二芳基醚类(biaryl ethers)、去甲基木脂体类(norlignans)、螺二烯酮类(spirodienones)、黄酮木脂体类(flavonolignans)、香豆素木脂体类(coumarinolignans)、木脂体环烯醚萜类(lignan-iridoid complexs)等,下面举一些具体的例子。

从云南八角(*Illicium simonsii*)中获得的 isomagnolone(**67**),是一种二芳基醚类,两个 C_6 ~ C_3 单元以氧原子相连,又称氧木脂体类[32]。从厚壳树属 *Ehretia ovalifolia* 得到的化合物 **68**[33],和从大麻(*Cannabis sativa*)果实中分得的结构上带有对羟基苯乙胺基的 cannabisins E(**69**)和 cannabisins F(**70**)都属于这一类[34]。

67　68

69　70

有的木脂体结构中侧链部分失去一两个碳原子,文献中仍然把它们归属于木脂体类,如从大叶仙茅(*Curculigo capitulata*)得到的化合物 **71**[35],从椿叶花椒(*Zanthoxylum ailanthoides*)得到的 ailanthondol(**72**)[36] 都属于这类去甲木脂体类。

71　　**72**

从海风藤(*Piper futokadsura*)茎叶中分得的 futoenone(**73**)和从 *Coptis japonica* 根茎中得到的化合物 **74** 为螺环二烯酮类[37]。

73　　**74**

从毛蕊花属植物 *Verbascum sinaiticum* 叶中得到的 Sinaiticin (**75**)是一种黄酮木脂体类[38]。从黄牛木(*Cratoxylum cochinchinese*)分离得到的 5′-demethoxy-cadensin G(**76**)是一种酮木脂体(xanthonolignan)[39]。从大叶醉鱼草(*Buddleia davidii*)根中获得多种木脂体环烯醚萜类化合物,化合物 **77** 为其中之一[40]。

75　　**76**

77

从紫杉(*Taxus brevifolia*)树皮中发现一种二萜木脂体(diterpenelignan) brevitaxin(**78**)[41],从植物 *Hemidesmus indicus* 中分离得到的是一种香豆素木脂

体 **79**[42]。

78

79

第三节　木脂体的生物活性

天然木脂体结构类型众多,并有大量的取代基变化和立体异构体,因此生物活性十分广泛。但在已经发现的化合物中,经过较深入活性测试的仍然很少。下面将举例说明木脂体的一些主要生物活性。

一、抗肿瘤活性

不少木脂体具有细胞毒作用,可以抑制肿瘤细胞的生长。其中鬼臼毒素是研究得较多的一种,它存在于小檗科鬼臼属的许多植物中,如鬼臼、八角莲、窝儿七等。从这些植物中提取的树脂民间曾用作泻剂、治疣等。后来发现其中所含的木脂体类成分具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,鬼臼毒素为主要活性成分,曾将其提纯试用于治疗皮肤癌、湿疣等,但毒性较大,临床上难以推广应用。后经结构改造,半合成一系列化合物,其中 VP-16(etoposide)和 VM-26(teniposide)已在临床上广泛应用。在衍生物制备中发现 7,8,7′,8′-位的构型是重要的,天然的为 7α, 8β, 7′α, 8′α,假如异构化成苦鬼臼毒素,即 8α, 8′β 后,细胞毒活性就大大下降。进一步研究发现,鬼臼毒素类的作用机理是抑制人 DNA 复制中十分关键的拓扑异构酶 Ⅱ(topoisomerase Ⅱ)的活性,进而用这种酶进行活性粗筛,又从鬼臼毒素的衍生物中发现很多各有特色的抗肿瘤活性化合物[43]。

其他类型的木脂体如 machilin、matairesinol 和厚朴酚、厚朴酚等也具有细胞毒活性[44]。

二、抗病毒活性

新疆紫草(*Arnebia euchroma*)民间用于治疗麻疹不透。从中分离得到的咖啡酸四聚体,在植物体内以 K^+、Na^+ 盐存在,具有抑制 HIV 的活性[45],其中抑制 H_9 细胞生长活性(IC_{50})为 45~60μg/mL。

从内南五味子中分离得到的 gomisin G 也有抑制 HIV 增殖的作用[46]。

其他如从叶下珠属草药 *phylianthus myrtipolinus* 中分离到的木脂体类 retrojusticidin B 和 phyllamyricin 具有抑制 HIV-1 的逆转录酶和 DNA 聚合酶 α 的作用[47]。鬼臼毒素类对麻疹和单纯疱疹病毒Ⅰ有抑制作用。

三、对心血管系统的作用

海风藤中木脂体成分对血小板活化因子(PAF)有拮抗活性,其中海风藤酮(kadsurenone)活性最强,浓度为 3.0μmol/L 时抑制率达 95%;从异型南五味子(*Kadsura heteroclita*)分离得到的多种联苯环辛烯类木脂体也具有 PAF 拮抗活性,其中(+)-gomisin M_1 的 IC_{50} 为 3.0μmol/L[48]。从华中五味子中获得的 pregomisin 也具有 PAF 拮抗作用[49]。

一些芳基萘的酯和它的杂原子衍生物具有降脂作用,在大鼠实验中,不但可以降低血清胆固醇水平,而且可以提高高密度脂蛋白的水平[50]。不少木脂体还具有抗氧化作用[51],如芝麻中的多种木脂体有此作用,所以有人推荐芝麻为保健食品。

四、保肝作用

五味子和华中五味子果实中含有的联苯环辛烯类木脂体均有保肝和降低血清谷丙转氨酶(SGPT)作用,如五味子酯甲和五味子丙素。化学结构中的亚甲二氧基可能是重要的活性基团。在化学合成五味子丙素时,发现中间体联苯双酯(bifendate)也具有降低转氨酶,改善肝炎症状的作用,临床上曾用于迁延性肝炎的治疗[52]。

五、其他作用

五味子醇甲(schizandrin)具有明显的中枢安定作用,是五味子镇静的主要活性成分。厚朴的镇静和肌松作用也与厚朴酚和厚朴酚等有关。

爵床属植物 *Justicia hayatai* 中的爵床素 A、B 和山荷叶素均有毒鱼作用,其毒性与鱼藤酮(rotenone)相似,而对昆虫和高等动物则毒性很小。

此外,还报道木脂体类具有抗过敏、抗炎、抗菌、杀虫等其他生物活性。

参 考 文 献

[1] 徐任生. 天然产物化学. 北京:科学出版社, 1993, 710
[2] 姚新生. 天然药物化学. 北京:人民卫生出版社, 1994, 143
[3] Freudenberg K et al. Tetrahedron, 1961, 15:115
[4] Gottlieb O R. Fortschr Chem Org Naturstoff, 1978, 35:1
[5] IUPAC Commission.Pure Appl Chem, 1999, 71: 587
[6] Moss G P. Pure Appl Chem, 2000, 72:1493
[7] Davin L B et al. Science, 1997, 275:362
[8] Katayama T et al. Mokuzai Gakkaishi, 1997, 43:580
[9] Slanina J et al. Planta Med, 1997, 63:277
[10] Harris R K et al. Cereal Foods World, 1993, 38:147
[11] One H et al. J Chromatogr B, 1995, 674:293
[12] Agrawal P K et al. Magn Reson Chem, 1994, 32:753
[13] Satyanarayana P et al. Tetrahedron, 1991, 47: 8931
[14] Wang H et al. Chin Chem Lett, 1993, 4:31
[15] Carroll A R et al. Aust J Chem, 1994, 47: 937
[16] Inagaki I et al. Chem Pharm Bull, 1972, 20:2710
[17] Rastrelli L et al. J Nat Prod, 2001, 64:79
[18] Lee S S et al. J Nat Prod, 1996, 59:1061
[19] Su B N et al. Planta Med, 1999, 65:558
[20] Gireger H et al. Tetrahedron, 1980, 36:3551
[21] 何明等. 药学学报. 2001, 36(4):278
[22] 王金辉等. 中草药, 2001, 32:15
[23] Zhang S X et al. J Nat Prod, 1995, 58:540
[24] Fukuyama Y et al. Chem Pharm Bull, 1992, 40:252
[25] Dias S M C et al. Phytochem, 1986, 25:213
[26] Mitsunaga K et al. Natural Medicines, 1996, 50:325
[27] Micard V et al. Phytochem, 1997, 44:1365
[28] Kouno I et al. Chem Pharm Bull, 1994, 42:112
[29] Sy L K et al. Phytochem, 1996, 43, 1417; 1997, 45, 211
[30] (a) Tanaka T et al. J Nat Prod, 1996, 59, 843
(b) Tanaka T et al. Chem. Pharm Bull, 1997, 45, 1596
[31] Yoshikawa K et al. J Nat Prod, 1997, 60:511
[32] Kouno I et al. Chem Pharm Bull, 1994, 42:112
[33] Yoshikawa K et al. Phytochem, 1995, 39:659
[34] Sakakibara I et al. Phytochem, 1995, 38:1003

[35] Chang W L et al. J Nat Prod, 1997, 60:76
[36] Sheen W S et al. Phytochem, 1994, 36:213
[37] Yoshikawa K et al. J Nat Prod, 1997, 60:511
[38] Afiti M S A et al. Phytochem, 1993, 34:839
[39] Venkatraman G et al. Tetrahedron Lett, 1996, 37:2643
[40] Yamamoto A et al. Phytochem, 1993, 32:421
[41] Arslanian R L et al. J Nat Prod, 1995, 58:583
[42] Das P C et al. Indian J Chem Sec B, 1992, 31:342
[43] Cho S J et al. J Med Chem, 1996, 39:1396
[44] Hirano T et al. Life Sci, 1994, 55:1061
[45] Kashiwada Y et al. J Nat Prod, 1995, 58:292
[46] Chen D F et al. Bioorg Med Chem, 1997, 5:1715
[47] Liu KCSC et al. Med Chem Res, 1997, 7:168
[48] Han G Q et al. J Chin Pharm Sci, 1992, 1(1):20
[49] Lee I S et al. Arch Pharm Res, 1997, 20:633
[50] Kuroda T et al. Chem Pharm Bull, 1997, 45:678
[51] Nitao J K et al. J Chem Ecol, 1992, 18:1661
[52] 刘耕陶. 药学学报, 1983, 7:1

第十六章　其他生物活性天然化合物

本章纳入的化合物,均为未能归入上述各章的一些较重要的具有生物活性的天然化合物。

第一节　含硫化合物

含硫天然化合物是较特有的天然化合物。一些具臭味的植物与中草药,如大蒜、葱、韭菜、芥子等都含有硫化物。许多十字花科植物,如松蓝 (在中药中其叶称大青叶,根称板蓝根)、葶苈子、萝卜、荠菜等也都含硫因而有些异味。这些含硫化合物一般都具有生物活性,应给予重视。

一、蒜辣素与二烯丙基三硫

大蒜(*Allium sativum*)是众所周知的保健食品,也是一味常用中药,有悠久的应用历史,具抗菌、消炎、抗原虫、降血脂及防治肿瘤等功能。大蒜本身并无臭味,但在粉碎与加工过程中产生蒜辣素[allicin,**6**,二烯丙基硫代亚磺酸酯(diallyldisulfide oxide)]具有臭味。蒜辣素是大蒜的主要抗菌成分。一般认为蒜辣素产生的过程是大蒜粉碎后其所含不稳定的蒜氨酸(alliin,**1**)或(+)-*S*-烯丙基半胱氨酸亚砜[(+)-*S*-allylsysteine-*S*-oxide] 经蒜酶(allicinase)分解成烯丙次磺酸(allyl-sulfenic acid,**2**)和烯丙氨酸(**3**),**2** 再进一步生成烯丙亚磺酸(allylsulfinic acid,**4**)与烯丙硫醇(allylmercaptan,**5**),它们继续失水生成具有臭辣味的蒜辣素[1]。

$$\underset{\mathbf{1}}{H_2C{=}CH{-}CH_2{-}\underset{\downarrow\atop O}{S}{-}CH_2{-}\underset{|\atop NH_2}{CH}{-}COOH} \xrightarrow{\text{酸酶}} \underset{\mathbf{2}}{H_2C{=}CH{-}CH_2{-}\underset{\downarrow\atop O}{S}H} + \underset{\mathbf{3}}{H_2C{=}\underset{|\atop NH_2}{C}{-}COOH}$$

$$2\underset{\mathbf{2}}{H_2C{=}CH{-}CH_2{-}\underset{\downarrow\atop O}{S}H} \longrightarrow \underset{\mathbf{4}}{H_2C{=}CH{-}CH_2{-}\underset{\downarrow\atop O}{S}{-}OH} + \underset{\mathbf{5}}{H_2C{=}CH{-}CH_2{-}SH}$$

$$\downarrow -H_2O$$

$$\underset{\mathbf{6}}{H_2C{=}CH{-}CH_2{-}\underset{\downarrow\atop O}{S}{-}S{-}CH_2{-}CH{=}CH_2}$$

蒜氨酸为针状结晶,熔点 164~166℃,$[\alpha]_D^{20}$ 为 +63.5°(c 2, H_2O);蒜辣素为油状,d_4^{20} 为 1.112,n_D^{20} 为 1.561,pH 为 6.5。

1975 年,Treeman 等证实蒜氨酸由 85% 蒜氨酸、13% *S*-甲基半胱氨酸亚砜(**7**)与 2% *S*-丙基半胱氨酸亚砜(**8**)组成。在蒜酶作用下,这些混合物产生硫代甲亚磺酸-*S*-烯丙酯(**9**),硫代甲亚磺酸-*S*-甲酯(**10**)及其他硫代亚磺酸酯 R—SO—S—R′(R,R′分别为甲基、丙基、烯丙基等)[2]。蒜辣素遇热分解成烯丙次磺酸与烯丙硫醛(**11**),后者在常温下发生 Diels-Alder 反应,二聚成 1,2-二硫杂-5-环己烯(**12**)、2-乙烯-1,3-二硫杂-5-环己烯(**13**)等[3]。

$H_3C—S(\rightarrow O)—CH_2—CH(NH_2)—COOH$ **7**

$H_3C—CH_2—CH_2—S(\rightarrow O)—CH_2—CH(NH_2)—COOH$ **8**

$H_3C—S(\rightarrow O)—S—CH_2—CH═CH_2$ **9**

$H_3C—S(\rightarrow O)—S—CH_3$ **10**

$H_2C═CH—CH_2—S(\rightarrow O)—S—CH_2—CH═CH_2 \xrightarrow{\triangle} H_2C═CH—CH_2—SH(\rightarrow O) + S═CH—CH═CH_2$

6 → **2** + **11**

$2S═CH—CH═CH_2 \longrightarrow$ **12** + **13**

11　　**12**　　**13**

1996 年,张学俊等认为蒜氨酸不应是较稳定的亚砜结构,而可能是容易氧化分解的硫醚结构(*S*-烯丙基-L-半胱氨酸),它与蒜酶结合空气中的氧立即氧化成亚砜[4]。大蒜中的硫化物有多种报道,这主要是由于硫化物的不稳定而产生各种分解产物及聚合物。

郎彝江等发现大蒜中抗真菌成分应是较稳定的二烯丙基三硫(diallyltrisulfide,**17**),称为大蒜新素。将 50kg 大蒜粉碎后加等量水,经水蒸气蒸馏,用冰盐水冷却蒸馏液,分出大蒜油(170g),再进一步蒸馏收集 85~100℃/1 mm Hg 馏分(120g),经分析主要为二烯丙基三硫(含量在 40%左右,n_D^{20} 为 1.572~1.582)。合成证明[5]二烯丙基三硫的结构:烯丙氯(**14**)与硫代硫酸钠反应得烯丙硫代硫酸钠(**15**),化合物 **15** 与硫化钠作用得烯丙二硫钠(**16**),化合物 **15** 与化合物 **16** 反应得化合物 **17**。

$$H_2C═CH—CH_2Cl + Na_2S_2O_3 \longrightarrow H_2C═CH—CH_2—S_2O_3Na$$

14　　**15**

$$\xrightarrow{Na_2S} H_2C═CH—CH_2—S—S—Na + Na_2SO_3$$

16

$$H_2C{=}CH{-}CH_2{-}S_2O_3Na + H_2C{=}CH{-}CH_2{-}S{-}S{-}Na \longrightarrow$$
15 16
$$H_2C{=}CH{-}CH_2{-}S{-}S{-}S{-}CH_2{-}CH{=}CH_2 + Na_2SO_3$$
17

二烯丙基三硫的质谱：*m/z* 178(M^+)、146、118、105($CH_2{=}CH{-}CH_2{-}S_2^+$)、73($CH_2{=}CH{-}CH_2{-}S^+$)、41 ($CH_2{=}CH{-}CH_2^+$)。^{1}H-NMR 谱：δ 3.48ppm(4H, $C\underline{H_2}{-}S{-}$)、δ 5.22ppm(4H, $-CH{=}C\underline{H_2}$)；δ 5.82ppm(2H, $-CH{=}CH_2$)；红外光谱：ν_{max} 为 1830cm^{-1} ($-CH{=}CH_2$)、1000cm^{-1} ($-CH{=}$)、3100cm^{-1} ($={CH}-$)。

质谱是分析鉴定大蒜各成分的主要工具，除分子离子峰外还可以从质谱碎片的分析协助鉴定结构，GC-MS 既可分离各成分又可鉴定各成分的结构[6]。但由于 GC 是在高温下操作，难以测定遇热不稳定的化合物，因而目前有采用反相 HPLC 直接测定各类成分，如测定烯丙基半光氨亚砜、γ-L-谷氨酰基 *S*-烷烯-L-半胱氨酸、5-烷(烯)基-L-半胱氨酸亚砜等[7,8]。LC-MS 的普及则为大蒜研究提供了更方便的分析手段。

市售大蒜新素针剂用于治疗白色念珠菌、隐球菌等真菌疾病，也用于治疗呼吸道、消化道、脑膜炎等细菌感染疾病。

无臭大蒜已逐渐在工业中生产。常见的方法是采用微波及柠檬酸调节 pH：大蒜粉碎后用明矾 0.03% 的 pH 为 4.0 柠檬酸溶液浸泡 2h，然后放入微波炉 850W 处理 3~4min，取出迅速冷却。这种无臭大蒜被认为除臭完全，有效成分存留率高[9]。

最近，Clement Ip 研究组报道大蒜中抗癌成分是含硒的氨基酸，γ-谷氨酰基-硒-甲基硒半胱氨酸(γ-glutamyl-Se-methyl-seleno cystein，**18**，GGMSC)，口服后 GGMSC 在体内酶解成已知的防癌抗癌硒化合物，硒-甲基硒半胱氨酸(Se-methyl-selenocysteine，**19**，MSC)，但在体内 **18** 和 **19** 的抗癌作用基本相同。GGMSC 口服后吸收很好，硒很快分布在体内各组织，最后通过尿液排出[10,11]。

$$H_3C{-}Se{-}CH_2{-}CH(NH{-}CO{-}CH_2CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH){-}COOH$$
18

$$H_3C{-}Se{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH$$
19

天然大蒜中含硒量为 1×10^{-4} ~ 3×10^{-4}，而用过含硒盐肥料生长的大蒜含硒量可增加到 1×10^{-3} 以上。

二、葱与洋葱中的活性化合物

葱(*Allium fistulosum*)和洋葱(*A. sepa*)所含成分是不很稳定的丙烯半胱氨酸亚砜{[(+)-*S*-prop-1-enyl-L-systeine-*S*-oxide]，**20**}。**20** 经酶解生成臭味的丙

烯基次磺酸(prop-1-enylsulfenic acid,**21**)。在碱性的条件下 **20** 生成蒜氨酸的异构体环蒜氨酸(cycloalliin,**22**)。在 6mol/L HCl 条件下,**22** 可生成噻嗪化合物(**23**),2-甲基牛磺酸(2-methyltaurine,**24**)与磺基丙氨酸(cysteic acid,**25**)[12,13]。**21** 也能再次分解成丙烯醇、丙醛及甲基戊烯醛等。

此外,韭菜(*Allium fuberosum*)也含蒜氨酸等含硫化合物[14]。

三、葶菜素[15]

葶菜素(rorifone,**23**)是从中药十字花科葶菜(也称江剪刀草 *Roripa montana*)中分离到的有效成分,具化痰与止咳功效。

经谱学分析,化合物 **23** 的结构为含砜基与氰基的长链烃基化合物,分子式为

$C_{11}H_{21}O_2NS$,针状结晶,熔点 45~46℃。此结构并为合成所证明。

焯菜素为中性化合物,不溶于酸水与碱水,能溶于乙醇,遇碘化铋钾试剂显橙红色。

焯菜素提取方法为:焯菜粉碎后加水浸泡,煮沸 1.5h,滤取提取液,药渣再用水煮沸提取 1h,合并两次水提取液,浓缩至草药量的 1/3,过滤,加乙醇使含醇量达 75%。乙醇溶液浓缩至草药量的 1/10,加等量水低温放置,析出的沉淀用 0.1mol/L NaOH 溶液洗涤 2 次,再用水洗至中性即得焯菜素粗品。粗品用氯仿溶解,蒸干后再用乙醇反复结晶,得率约 0.2%。粗品也可用硅胶柱色谱,乙酸乙酯洗脱。收集碘化铋钾显橙红色部位,用乙醇重结晶。

焯菜素的红外光谱:ν_{max} 为 $2240cm^{-1}$(—CN)、$1312cm^{-1}$、$1290cm^{-1}$、$1132cm^{-1}$(—SO_2)。^1H-NMR 谱:δ 2.90ppm(3H, s,—CH_3)、δ 3.03ppm(2H, t,—C$\underline{H}_2$—CH_3)、δ 1.30~1.90ppm(14H, m,—$CH_2\times 7$)、δ 2.34ppm(2H, t,—CH_2CN)。EIMS: m/z 232($M^+ +1$)、216(M^+—CH_3)、79($CH_3SO_2^+$)及 152、138、124、110、96、82、68、54 等碎片,相应为 m/z 40(CH_2CN^+) + $n\times 14$(CH_2)的系列峰,但没有 $n = 9$的离子峰,说明 CH_2CN 的左侧只有 8 个 CH_2。

焯菜中除分到化合物 **26** 外,也分到焯菜酰氨(rorifamide,**27**),分子式为 $C_{11}H_{23}O_3NS$,熔点 136℃。化合物 **27** 不具有止咳化痰作用。

$H_3C—SO_2—CH_2—(CH_2)_7—CH_2CN$　　**26**

$H_3C—SO_2—CH_2—(CH_2)_7—CH_2—CONH_2$　　**27**

四、其他含硫天然化合物

白芥(*Brassica alba*)的种子白芥子含白芥子苷(sinalbin,**28**)[16]。

28

芥(*Brassica juncea*)的种子芥子及荠菜(*Capsella bursa-pastoris*)含芥子苷(sinigrin,**29**)[17]。

$H_2C{=}HC{-}H_2C{-}C{=}N{-}O{-}SO_3^-K^+$ (29)

30 R=H

31 R=OCH_3

32 R=SO_3^-

松蓝(*Isatis tinctoria*)的叶子在中药上称大青叶,根称板蓝根。其含芸苔苷(glucobrassicin, **30**)、新芸苔苷(neoglucobrassicin, 1-methoxyl-3-indolylmethyl glucosinolate,**31**)、1-磺基芸苔苷(1-sulfo-3-indolylmethyl glucosinolate,**32**)[18]等。中医用大青叶及板蓝根治疗感冒、抗菌消炎、抗病毒,但以上成分是否和这些作用有关联还不清楚。

萝卜(*Raphanus sativus*)根含萝卜苷(glucoraphenin,**33**)[19]。

$H_3C{-}S(\rightarrow O){-}HC{=}HC{-}CH_2{-}CH_2{-}C{=}N{-}O{-}SO_3^-K^+$ (33)

在这些化合物中硫和氮组成的磺酸盐与异硫氰酸酯,外用时有消炎与止痛作用,其他生物活性作用未见报道。

第二节　含氰化合物

研究天然产物化学时,有时会遇到含氰化合物,其中不少此类化合物常与糖结合成苷。并根据糖基与氰基的位置而分为α-氰苷和γ-氰苷。前者如苦杏仁苷(amygdalin,lactrile),叶下珠苷等在自然界发现的大多属这一类;后者如垂盆草苷(sarmentosin)。大多数的α-氰苷在酸或酶的作用下即释放出氢氰酸,具有毒性;而γ-氰苷在酸或酶作用下一般不能释放氢氰酸。氰苷常形成水合物,能溶于水,乙醇中溶解度较小,难溶于氯仿、乙醚等非极性溶剂。氰苷的提取方法与提取一般苷类化合物相同,为避免酶解可用乙醇提取。

氰苷的谱学特征:氰基在 UV 中显示 λ_{max} 为 119nm 的吸收峰;IR 中有 ν_{max} 为 2250 cm^{-1} 的吸收峰;^{13}C-NMR 信号为 120 ppm,糖基其他信号与一般苷类化合物的类同。

一、苦杏仁苷

苦杏仁苷(**34**)是从苦杏仁(*Prunus armenica*)及桃、李、樱桃、苹果等种子中分出的氰苷,为常见的α-氰苷,由杏仁腈(mandelonitrile,**36**)与龙胆双糖(gentiobio-

se)缩合而成的双糖苷。其为柱状结晶,分子式为 $C_{20}H_{27}NO_{11} \cdot 3H_2O$,熔点 200℃,$[\alpha]_D$ 为 -42°(无水物)。化合物 **34** 遇杏仁酶(emulsin)酶解出一分子葡萄糖而成杏仁腈与一分子葡萄糖的野樱苷(prunasin,**35**),后者可继续酶解生成一分子葡萄糖和杏仁腈(**36**)。杏仁腈遇热也容易分解成苯甲醛与氢氰酸。苦杏仁苷遇酶作用除释放出葡萄糖外,也可释放出氢氰酸。如果用酸水解则直接得到两分子葡萄糖、苯甲醛与氢氰酸,因而苦杏仁有一定毒性。

HOH₂C, HO, HO, OH, H, O, O, CH₂, HO, HO, OH, H, O, O, H, C, CN, **34** —杏仁酶→ HO, CH₂, HO, HO, OH, H, O, O, H, C, CN, **35** + β-D-葡萄糖 —杏仁酶↓ HO, H, C, CN, **36** + β-D-葡萄糖 → HCN + OHC—(苯环)

苦杏仁苷的提取方法为苦杏仁压榨去油后,用乙醇回流提取,提取液浓缩后即析出杏仁苷结晶,必要时也可加乙醚使析出结晶。苦杏仁苷的含量在苦杏仁中高达 3%左右。

20 世纪 50 年代时,苦杏仁苷曾被宣称有抗癌作用,并取名 Vit. B_{17},风行一时。80 年代经美国国家肿瘤研究所(NCI)研究证明没有抗癌作用,随后 FDA 正式宣布维生素 B_{17} 无效[20~22]。

二、垂盆草苷与异垂盆草苷

(一) 垂盆草苷

垂盆草苷(**37**)是从景天科垂盆草(*Sedum sarmentosum*)中分离出的抗肝炎有效成分,为γ-氰苷,无色透明胶状物[23],容易溶于水,分子式为$C_{11}H_{17}O_7N$,$[\alpha]_D$ 为 -17.4°(c 0.62,H_2O)。

临床实验证明化合物 **37** 有降低肝炎患者血清谷丙转氨酶(SGPT)作用。当化合物 **37** 用酸水解或酶解时仅得葡萄糖,并未分到苷元,这说明苷元的稳定性很差。由于分子中的氰基与双键相连接,水解时不释放氢氰酸,所以垂盆草无毒性。

垂盆草苷的提取:垂盆草全草粉碎后用 95%乙醇回流提取,提取液浓缩,残渣用水磨溶,再加氯仿以洗去叶绿素等杂质,水层减压浓缩。浓缩液使通过颗粒状活性炭柱,先水洗脱,再用 70%乙醇洗脱,醇洗脱液减压浓缩后用硅胶色谱,依次用

水饱和的乙酸乙酯及乙酸乙酯-甲醇(8∶1)洗脱。TLC检测,将含垂盆草苷部分(α-苯酚阳性)合并,再进行二次硅胶色谱纯化,乙酸乙酯-丙酮(3∶2)洗脱,垂盆草苷的得率约0.1%。

UV:(MeOH)λ_{max}(lgε)为212nm(4.02)。

IR:ν_{max}为3540cm^{-1}(—OH)、2238cm^{-1}(—CN)、1640cm^{-1}(双键)、1110cm^{-1}(—O—)。

MS:m/z为276(M^++1)、m/z为257(M^+-H_2O)。

^{1}H-NMR(C_5D_5N):δ6.70ppm(1H,t,J=6,烯质子)、δ4.30ppm(1H,d,J=12,糖端基质子)、δ3.82~4.20ppm(7H,m,—OCH_2×3,$C_{5'}$—H)、δ4.48~4.76ppm(3H,m,糖基$C_{2'}$—$C_{4'}$质子),δ5.20~7.40ppm(5H,—OH×5)。

^{13}C-NMR(D_2O):糖基部分δ103.0ppm(d,C_1)、δ74.3ppm(d,C_2)、δ77.2ppm(d,C_3)、δ70.8ppm(d,C_4)、δ77.0ppm(d,C_5)、δ62.0ppm(t,C_6)。苷元部分δ63.0ppm(t,—OCH_2)、δ145.0ppm(d,=CH)、δ117.4ppm(s,=C)、δ68.4ppm(t,CH_2OH)、δ117.7ppm(s,—CN)。

垂盆草苷用硫酸及乙酸酐酰化后得无色针状结晶的五乙酰化合物,熔点80℃。

MS:m/z为485(M^+)、m/z为443(M^+-$COCH_2$)、m/z为426(M^+-$OCOCH_3$)。

^{1}H-NMR(CCl_4):δ1.91ppm、δ1.96ppm、δ2.01ppm、δ2.07ppm(15H,s,1∶2∶1∶1,CH_3CO×5)。糖基部分:δ3.70ppm(1H,m,C_5—H)、δ4.13ppm(2H,d,J=5,C_6—2H)、δ4.57ppm(1H,β-C_1—H)、δ4.96ppm(3H,m,$C_{2,3,4}$—H)。苷元部分:δ4.48ppm(2H,d,J=7,—CH_2OAc)、δ4.60ppm(2H,s,—O—CH_2—)、δ6.54ppm(1H,t,J=7,烯质子)。

上述结果说明垂盆草苷结构式如化合物**37**所示,随后为X射线衍射分析证明。

(二) 异垂盆草苷

垂盆草苷在稀碱水溶液中于室温即转化成异垂盆草苷(isosarmentosin, **38**),在乙醇中重结晶, $C_{11}H_{17}O_7N$,熔点 212℃, $[\alpha]_D^{21}$ 为 +51.4°(*c* 0.1, H_2O),但已无生物活性。

异垂盆草苷易溶于水,难溶于有机溶剂,对酸稳定,遇碱、加热则分解。无 UV 吸收。MS: *m/z* 275 (M^+)。IR (KBr): ν_{max} 为 3460cm^{-1}、3270cm^{-1} (—OH)、2230cm^{-1} (—CN),无双键吸收峰。^{1}H-NMR (C_5D_5N):显示 δ 3.20ppm(1H, m)及 δ 3.48ppm(1H, m)信号,无烯质子信号,推测可能由于分子内 Michael 亲核加成反应而成一新的环状化合物异构物。上述^{1}H-NMR 信号相应为 —C<u>H</u>(CN)—CH_2OH(δ 3.20ppm)与 C<u>H</u>—CH(CN)—CH_2OH(δ 3.48ppm)的信号。

垂盆草苷与异垂盆草苷^{13}C-NMR 信号比较见表 16-1。

表 16-1 ^{13}C-NMR 信号比较表

部位	垂盆草苷	异垂盆草苷	部位	垂盆草苷	异垂盆草苷
C-1	68.4 t	69.3 t	C-2′	74.3 d	80.0 d
C-2	117.4 s	37.1 d	C-3′	77.2 d	78.8 d
C-3	145.0 d	60.1 d	C-4′	70.8 d	71.0 d
C-4	63.0 t	72.0 t	C-5′	77.0 d	73.8 d
C≡N	117.7 s	120.0 s	C-6′	62.0 t	61.7 t
C-1′	103.0 d	98.2 d			

第三节 薏 仁 酯

薏仁酯(coixenolide, **39**)是从中药禾本科植物薏苡仁(*Coix lachrymajobi*)中分离得到的黄色油状物,有抗癌活性。

薏仁酯的提取分离[24]:薏苡仁干粉 2kg,先用丙酮于室温提取 3 次(每次 5 L),合并提取液,减压浓缩至干,得 86.6g 红棕色糖浆。后者用 450mL 石油醚溶解,过滤,滤液浓缩得 85g 红棕色糖浆。得率 4.25%。

取 20 g 糖浆使溶于石油醚,通过硅胶柱色谱。依次用石油醚 1L、乙醚、丙酮、乙酸乙酯、甲醇各 500mL 洗脱,各流分分别得到 3.75 g、1.5g、0.6g 与 0.1g。经艾氏腹水癌小鼠测试,仅石油醚部位有活性。

石油醚部分 15g 用 60mL 石油醚溶解后用 2mol/L KOH 溶液洗涤 2 次,分离出酸性物(11.7g)及溶于碱的中性物(3g)。经艾氏腹水癌小鼠测试,显示中性部

分有抗癌活性,酸性部分活性很弱。中性部分继续用 10 mL 氯仿溶解后,经过 1% 溴麝香酚兰(bromothymol blue)溶液浸泡过的氧化铝柱以完全去除酸性物质。氯仿洗脱,当柱上的黄色带移至柱底,即全柱成黄色后,改用丙酮洗脱,直至柱色转化成蓝色为止。氯仿洗脱液为中性成分 2.4g。丙酮洗脱液为碱性成分 0.52g, 两者均为油状物。

取中性油状物 250 mg 溶于 6mL 石油醚硅胶柱色谱,依次用乙醚-石油醚 4 ∶ 96 (100mL)、10 ∶ 90 (100mL)、50 ∶ 50(200mL) 洗脱,得到 A、B 两个流分,用艾氏腹水癌小鼠测试 B 为有效成分,命名为薏仁酯。

薏仁酯,元素分析得分子式为 $C_{38}H_{70}O_4$, n_D 为 1.4705 ,$[\alpha]_D^{20}$ 为 0°。

薏仁酯结构解析过程[25]:薏仁酯用钯碳氢化吸收两分子氢得四氢化合物(**40**),为无色结晶,熔点 56~ 61℃,化合物 **40** 在甲醇中用 0.1mol/L NaOH 甲醇溶液加热水解得 2,3-丁二酸(**41**)与混合有机酸的结晶,熔点 56~ 61℃,后者进一步用反相硅藻土色谱,依次分离得到等分子棕榈酸(palmatic acid,**42**,熔点 63℃)与硬脂酸(steric acid,**43**)。

$$\underset{\mathbf{39}}{\begin{matrix}CH_3 \\ | \\ CH-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_9-\overset{H}{\overset{|}{C}}=\underset{H}{\underset{|}{C}}-(CH_2)_5-CH_3 \\ | \\ CH-O-\underset{O}{\underset{\|}{C}}-(CH_2)_7-\underset{H}{\underset{|}{C}}=\underset{H}{\underset{|}{C}}-(CH_2)_5-CH_3 \\ | \\ CH_3\end{matrix}} \xrightarrow{Pd/H} \underset{\mathbf{40}}{\begin{matrix}CH_3 \\ | \\ CH-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_{16}-CH_3 \\ CH-O-\underset{O}{\underset{\|}{C}}-(CH_2)_{14}-CH_3 \\ | \\ CH_3\end{matrix}}$$

$$\mathbf{40} \xrightarrow{NaOH} \underset{\mathbf{41}}{\begin{matrix}CH_3 \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH_3\end{matrix}} + \underset{\mathbf{42}}{H_3C-(CH_2)_{14}-COOH} + \underset{\mathbf{43}}{H_3C-(CH_2)_{16}-COOH}$$

$$\mathbf{39} \xrightarrow{KOH} \begin{matrix}CH_3 \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH_3\end{matrix} + \underset{\mathbf{44}}{CH_3-(CH_2)_7-\underset{H}{\underset{|}{C}}=\underset{H}{\underset{|}{C}}-(CH_2)_5-COOH} + \underset{\mathbf{45}}{CH_3-(CH_2)_9-\overset{H}{\overset{|}{C}}=\underset{H}{\underset{|}{C}}-(CH_2)_5-COOH}$$

如果化合物 **39** 未经氢化,直接用 KOH 乙醇加热水解得油状混合物酸与 2,3-丁二醇。前者经分馏得酸 A(沸点 107℃,分子式为 $C_{16}H_{30}O_2$)与酸 B,沸点 125℃,熔点 37℃,分子式为($C_{16}H_{34}O_2$)。酸 A 与 B 分别制成β-溴苯乙酮酯(β-bromophenacyl ester)并与标准品对照证明相应为顺式-11-十六碳烯酸(**44**)与反式-11-十八碳烯酸(**45**)。

薏仁酯的 IR:ν_{max} 在酯基 $1730cm^{-1}$ 吸收峰外,并有反式二取代乙烯扭曲振动吸收峰 $960cm^{-1}$,这一吸收峰在化合物 **45** 中显得更强,但化合物 **40** 与 **44** 都没有见到这一吸收峰。

我国中医用薏苡仁治疗肿瘤,新药“康莱特注射液”也是用薏苡仁制备的。其中抗癌有效成分是薏仁酯或其他有效成分未见报道。

第四节　白藜芦醇

白藜芦醇(resveratrol,**46**)[26] 是从葡萄的种子或果皮中分得的二酚乙烯(stilbene)类化合物($C_{14}H_{12}O_3$),结构为 3′,4,5′-三羟基-1,2-二苯乙烯(3′,4,5′-trihydroxylstilbene),淡黄色结晶,熔点 265~267℃。

IR:ν_{max}^{KBr} 为 3200~3300cm^{-1}(OH)、1630cm^{-1}($>C=C<$)、1600cm^{-1}、1595cm^{-1}、1510cm^{-1}(芳环)、965cm^{-1}(反式—CH═CH—)。

^1H-NMR(d_6-丙酮):δ(ppm)6.28(1H, t, J = 2, $C_{4'}$—H)、6.55(2H, d, J = 2, $C_{2',6'}$—H)、6.76(1H, d, J = 17)、7.08(1H, d, J = 17, 反式—CH═CH—),6.82(2H, d, J = 9), 7.40(2H, d, J = 9, 芳环-H, A_2B_2 型, q)、δ8.23(3H, brs, 3× OH)。

三乙酰化合物的^1H-NMR 显示(d_6-丙酮)δ(ppm)2.23(9H, S, 3× OAc)、6.38(1H, t, J = 2, $C_{4'}$—H)、7.20~7.40(4H, 芳环 H 与—CH═CH—)、7.08(2H, d, J = 9)、7.60(2H, d, J = 9, 芳环-H, A_2B_2 型, q)。

46

研究表明,白藜芦醇有抗癌与抗氧化作用。它在红葡萄酒中的含量高于白葡萄酒。因而认为适量饮用红葡萄酒有防癌与抗衰老作用。除葡萄子外,中草药如虎杖、大黄等都含有化合物 **46**。

(1) 提取

植物荆三棱(*Scirpus fluviatilis*)的根粉 4.8kg,先用正己烷回流提取 4 次,再用甲醇回流提取 5 次,合并甲醇提取液,减压浓缩得棕黑色物 550 g,使溶于 2 L 水用丁醇反复提取(共耗 8L),丁醇液减压浓缩得 26g,经硅胶柱层析,氯仿洗脱得白桦脂酸(betulinic acid)0.13g,氯仿不溶物(103g)用硅胶柱层析,苯-乙醚混合溶剂

洗脱,苯-乙醚(6 ∶ 4)洗脱液部分先后得白藜芦醇 0. 81g 及 3,3′,4,4′-四羟基-1,2-二苯乙烯 0. 56g。

(2) 合成

文献中记载了许多合成白藜芦醇及其类似物方法,现仅举一种比较成功的方法[27,28]。

$$\text{3,4-(HO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOCH}_3 \xrightarrow[\text{K}_2\text{CO}_3\text{,DMF},\ 82\%]{\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Br}} \text{3,4-(BzO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOCH}_3 \xrightarrow[88\%]{\text{LiAlH}_4} \text{3,4-(BzO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{OH}$$

$$\xrightarrow[83\%]{\text{PBr}_3} \text{3,4-(BzO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{Br} \xrightarrow[\text{P(OEt)}_3,\ 95\%]{(n\text{-Bu})_4\text{N}^+\text{I}^-} \text{3,4-(BzO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{—P(=O)(OEt)}_2 \xrightarrow{\text{BzO—C}_6\text{H}_4\text{—CHO}}$$

$$\text{3,4-(BzO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{—CH=CH—C}_6\text{H}_4\text{—OBz} \xrightarrow[\text{AlCl}_3,\ 69\%]{(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_5} \text{3,4-(HO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{—CH=CH—C}_6\text{H}_4\text{—OH}$$

第五节　麝　香　酮

麝香酮(muscone,**62**,3-甲基环十五烷酮,3-methyl-cyclopentadecanone)是常用中药麝香的主要芳香成分,也是有效成分,含量为 1. 5%~ 2%。麝香是鹿科动物麝(*Mouschcus berezovskii*)成熟雄体香囊中的分泌物,是重要中药,有开窍醒神、活血通经、消肿止痛等功效,是治疗冠心病、心绞痛、肝性脑病(醒神)等中药方剂(如治疗白喉、扁桃腺炎、咽喉炎的六神丸)的主要成分之一。药理实验表明化合物 **62** 有兴奋中枢神经(小剂量时)与抑制神经(大剂量时)、消炎、强心、抗癌、抗早孕等作用。麝香中除含化合物 **62** 外,还有蛋白质、氨基酸、卵磷脂、雄甾醇、胆甾醇、尿素、碳酸铵等多种成分。

麝香酮虽是麝香中的主要成分,但单独用它并不能替代麝香。国内一些研究单位已完成人工麝香的制备,估计是化合物 **62** 与某些其他成分的混合物,已用于临床。

麝香酮为一环状烷酮结构($C_{16}H_{30}O$),天然麝香酮为左旋化合物。沸点 328℃,$bp_{0.5}$ 130℃,d_4^{17} 为 0. 9221,n_D^{17} 为 1. 4802,$[\alpha]_D$ 为 - 11. 3°(*c* 0. 91,MeOH),有强烈香味,不溶于水,能溶于乙醇。

麝香来源稀少,麝香酮的结构并不复杂,文献有许多合成麝香酮的报道。如 Stoll 等报道由 15-十六烷二酮经环合成去氢麝香酮再氢化得麝香酮[29]。也有方法是由环十二酮扩环成十五酮制成麝香酮的[30]。中国王大升等[31]利用价廉易得

的石油化工产品环十二酮为原料,合成(±)-麝香酮与 *R*-(-)-麝香酮,其关键步骤是偶氮二异丁腈(AIBN)和三正丁基氢化锡(Bu_3SnH)引发和传递的 2-乙氧羰基-2-(2′-甲基-3′-苯硒基)环十二酮的自由基扩环反应。

下面介绍合成麝香酮[消旋物(**52**)与光学活性物(**62**)]。

将环十二酮(**47**)制备成 2-乙氧羰基环十二酮(**48**),再在 NaH 苯溶液中与 2-甲基-1-苯硒基-3-碘丙烷(**49**)烷基化成化合物 **50**, **50** 在苯溶液中与 AIBN 与 Bu_3SnH 回流,自由基扩环反应产生 3-甲基-5-乙氧羰基环十五酮(**51**),再经浓盐酸水解,以乙酸酮催化,通过乙酸铅的氧化作用脱羧再氢化成消旋麝香酮(**52**),总收率 51%。

化合物 **49** 由 2-甲基-1,3-丙二醇(**53**)先与甲苯磺酰氯作用生成甲苯磺酸酯,再与碘化钠反应成碘化物(**54**),而后与二苯二硒及硼氢化钠反应得 2-甲苯-1-苯硒基-3-碘丙烷(**49**)。

消旋麝香酮(**52**),无色油小状物,分子式为 $C_{16}H_{30}O$, $bp_{0.01}$ 90℃, n_D^{26} 为 1.4767。MS:*m/z* 为 238(M^+, 35%)、223$(M-CH_3)^+$、209$(M-C_2H_5)^+$、195$(M-C_3H_7)^+$、180$(M-C_2H_5CO)^+$、125$(C_7H_{13}CO)^+$、97$(C_5H_9CO)^+$、86{$[CH_2—C(OH)C_3H_7]^+$,100%}、69$(C_3H_5CO)^+$、55$(C_2H_3CO)^+$、41$(C_3H_5)^+$。

^{1}H-NMR:δ(ppm) 0.93 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 3-CH_3)、1.45 [23H, m, (4-14)-CH_2, 3-H]、2.30(4H, m, 2-CH_2, 15-CH_2)。

IR:ν_{max} 为 1700cm^{-1}(—CO)、1110cm^{-1}(—C—CO—C)。

UV:λ_{max}(lgε)为 285nm(1.54)。

为制备光学活性麝香酮(**62**),用光学活性(*S*)-1-2-甲基-3-溴丙醇(**55**)为原料,先与二氢吡喃反应成(*S*)-1-2-甲基-3-溴丙基四氢吡喃醚(**56**),再按制备化合物 **50** 的程序由化合物 **48** 与化合物 **56** 制备成 2-乙氧羰基-2[(*R*)-2′-甲基-3′-四氢吡喃基]环十二酮(**57**)。化合物 **57** 和吡啶对甲苯磺酸盐(PPTS)反应,除去四氢吡喃保护基得 2-乙氧羰基-2-[(*R*)-2′-甲基-3′-羟基丙基]环十二酮(**58**),而后经对甲苯磺酰化,碘交换得碘化物(**59**),最后以苯硒基取代碘得苯硒化合物{2-乙氧羰基-2-[(*R*)-2′-甲基-3′-苯硒丙基]环十二酮(**60**)}。化合物 **60** 用 AIBN 与 Bu_3SnH 处理扩环成十五环酮酸酯(**61**)。后者经水解,脱羧及氢化,得光学活性(*R*)-麝香酮(**62**),总收率 32%。

(*R*)-麝香酮的 MS 与 IR 谱都与消旋体相同。^{1}H-NMR:δ(ppm) 0.93 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 3-CH_3)、1.5 [23H, m, (4-14)-CH_2, 3-H]、2.24(4H, m, 2-CH_2, 15-CH_2)。

O 47 → O COOEt 48

48 + I–(49)–SePh, NaH → 50 (O, COOEt, SePh) → AIBN / Bu_3SnH

48 + 56 → 58 X = OH; 59 X = I; 60 X = SePh (O, COOEt, X) → AIBN / Bu_3SnH

57 X= (O-tetrahydropyranyl, O O)

51 (O, COOEt) → HCl → (O, COOH) → $(CH_3COO)_2Cu$ → (O)

→ H_2 / H_2PtCl_6/C+$NaBH_4$ → 52 (O)

61 (O, COOEt) → HCl → (O, COOH) → $(CH_3COO)_2Cu$ → (O)

→ H_2 / H_2PtCl_6/C+$NaBH_4$ → 62 (O)

HO–53–OH → TsCl / NaI → I–54–I → PhSeSePh / $NaBH_4$ → I–49–SePh

Br–55–OH → (3,4-dihydro-2H-pyran, O) → Br–56–O–(O)

第六节　强心苷类化合物

一、引言

强心苷是能增强心肌收缩作用的甾体配糖体，其结构的共同点是甾体骨架，C-17位带有不饱和五元内酯环或双不饱和六元内酯环，C-3 位连有各种六碳糖。

Nativelle 于 1869 年首先从紫花洋地黄（*Digitalis purpurea*）中分离得到强心配糖体 digitaline，1935 年 Stall 等发现科学家们早期所分离得到的强心苷大多是已经酶解过的次生苷，并不是植物中原生的配糖体，次生苷虽有强心作用，但却远比原生苷弱[35]。于是，他们在解除植物中酶影响的条件下，首先从紫花地黄中分离得到了原生苷 purpurea glycoside A 与 B，以后又先后从毛花洋地黄（*Digitalis lanata*）、康毗毒毛旋花（*Strophanthus kombe* Oliv.）、海葱（*Scilla maritinma*）、夹竹桃（*Nerium indicum* Mill）等植物中分到许多原生的强心苷。

强心苷大多分布在玄参科（Scrophulariaceae）、夹竹桃科（Apocynaceae）、萝藦科（Asclepiadaceae）、百合科（Liliaceae）等植物的种子、根、茎、叶中，并以种子含量最高。中草药万年青的根，羊角拗种子中也含有强心苷。

临床上常用的强心苷有西地兰（cedilanid，deacetyllanatoside C）、地高辛（digoxine）、毒毛旋花素 K（K-strophanthin）、铃兰毒苷（convallatoxin）等多种。国内除毒毛旋花素 K 外，均已能生产。用以治疗急慢性充血性心力衰竭与节律障碍。用得最多的是洋地黄类强心药物西地兰与地高辛。

常见强心苷及物理性质见表 16-2。

63　$R_1 = R_2 = R_3 = H$，$R_4 = CH_3$

64　$R_1 = OH$，$R_2 = R_3 = H$，$R_4 = CH_3$

65　$R_1 = R_3 = H$，$R_2 = OH$，$R_4 = CH_3$

66　$R_1 = R_2 = H$，$R_3 = OH$，$R_4 = CHO$

67　$R_1 = OCOCH_3$，$R_2 = R_3 = H$，$R_4 = CH_3$

68　　**69**　　**70**　　**71**

表 16-2　常见的强心苷及其物理性质

名称	分子式	熔点/℃	[α]D	苷元				糖原	植物来源
				名称	分子式	熔点/℃	[α]D		
紫花洋地黄苷甲 (purpurea glycoside A)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	280	10.8° (75% EtOH)	洋地黄毒苷元(**63**) (digitoxigenin)	$C_{23}H_{34}O_4$	250	19.1° (MeOH)	3D-洋地黄毒糖(digitoxose)-D-葡萄糖	紫花洋地黄
毛花洋地黄苷甲 (lanatoside A)	$C_{49}H_{76}O_{19}$	248	31.1° (95% EtOH)	洋地黄毒苷元(**63**) (digitoxigenin)				2D-洋地黄毒糖-D-3-乙酰洋地黄毒糖-D-葡萄糖	毛花洋地黄
紫花洋地黄苷乙 (purpurea glycoside B)	$C_{47}H_{74}O_{19}$	242	15.6° (75% EtOH)	羟基洋地黄毒苷元(**64**) (gitoxigenin)	$C_{23}H_{34}O_5$	235	38.6° (MeOH)	3D-洋地黄毒糖(digitoxose)-D-葡萄糖	紫花洋地黄
毛花洋地黄苷乙 (lanatoside B)	$C_{49}H_{76}O_{20}$	248	36.7° (95% EtOH)	羟基洋地黄毒苷元(**64**) (gitoxigenin)				2D-洋地黄毒糖-D-3-乙酰洋地黄毒糖- D-葡萄糖	
毛花洋地黄苷丙 (lanatoside C)	$C_{49}H_{76}O_{20}$	248	33.4° (95% EtOH)	异羟基洋地黄毒苷元(**65**)(digoxigenin)	$C_{23}H_{34}O_5$	222	27.0° (MeOH)	2D-洋地黄毒糖-D-3-乙酰洋地黄毒糖- D-葡萄糖	毛花洋地黄
去乙酰毛花洋地黄苷或西地兰	$C_{47}H_{47}O_{19}$	268	12.0° (75% EtOH)	异羟基洋地黄毒苷元(**65**)(digoxigenin)				3D-洋地黄毒糖(digitoxose)-D-葡萄糖	毛花洋地黄
地高辛	$C_{41}H_{64}O_{14}$	265	13.3° (py)	异羟基洋地黄毒苷元(**65**)(digoxigenin)				3D-洋地黄毒糖(**69**)	毛花洋地黄
毒毛旋花素苷 K (k-strophanthoside)	$C_{42}H_{64}O_{19}$	220	13.9° (MeOH)	毒毛旋花素苷元(**66**) (strophanthidin)	$C_{23}H_{32}O_6$	178/232	43.1° (MeOH)	D-加拿大麻糖(**70**)(cymarose)-D-葡萄糖	毒毛旋花
毒毛旋花素 K (k-strophathin)	$C_{36}H_{54}O_{14}$	195	32.6° (H_2O)	毒毛旋花素苷元(**66**) (strophanthidin)				D-加拿大麻糖-D-葡萄糖	
铃兰毒苷	$C_{29}H_{42}O_{10}$	242	−15°(py)	毒毛旋花素苷元(**66**) (strophanthidin)				L-鼠李糖	铃兰
夹竹桃苷 (oleandrin)	$C_{32}H_{48}O_9$	250	−52.1° (MeOH)	夹竹桃苷元(**67**) (oleandrigenin)	$C_{23}H_{36}O_5$	225	−8.5° (MeOH)	L-夹竹桃糖(**71**)(oleandrose)	夹竹桃
海葱苷甲 (scillaren A)	$C_{36}H_{52}O_{13}$	270	−71.9° (MeOH)	海葱苷元(**68**) (scillarenin)	$C_{24}H_{32}O_4$	238	−16.8° (MeOH)	L-鼠李糖-D-葡萄糖	

二、强心苷的性质与检测

强心苷都是中性化合物,为无色结晶,味苦,有旋光性,和大多数配糖体一样能溶于乙醇、甲醇或水,难溶于乙醚、氯仿等溶剂。强心苷,包括苷元,分子内含羟基越多,亲水性越强,因此含有多个糖的强心苷有时能直接溶于水。强心苷在常温下尚算稳定,在酸或酶作用下容易水解或异构化。根据酸的强度而水解成带一个或几个糖的次生苷或苷元。强心苷的性质与其结构有关。

强心苷分子中β-型不饱和内酯环是强心作用的主要基团,而糖的连接则增加了它的溶解度与吸收,排泄作用。一般情况下,糖的连接越多,毒性越小,疗效越高。

针对强心苷结构中含甾体骨架、α,β-不饱和内酯环及脱氧糖、葡萄糖等特点,常用下列几种显色剂反应以鉴别结构,当然波谱解析仍属主要鉴定结构手段。

(1) Lieberman-Burchard 反应

取试管将样品溶于少量乙醇,将乙醇挥发至干滴加乙酸酐,样品全部溶解后(如样品能溶于乙酸酐则可直接用它溶解样品)沿管壁加入 0.5mL 浓硫酸,两液层间显紫色环,且乙酸酐层显蓝色,证明试样含甾体结构。

(2) Kedde 反应

将试液滴在滤纸上,滴加 Kedde 试剂(1g 3,5-二硝基苯甲酸溶于 50mL 甲醇,加入 1 mol/L KOH 50mL)显紫红色斑点,证明试样含α,β-不饱和内酯。

(3) Keller-Kiliani 反应

于试样中加 0.5% $FeCl_3$ 的乙酸溶液,沿管壁加浓硫酸,两液面间显棕色或其他颜色,乙酸层显蓝色,证明试样含 2-脱氧糖。

三、强心苷的提取与分离

从植物中分离提纯强心苷是比较复杂与困难的工作,这是因为它在植物中的含量一般都比较低(1%以下),又常常与性质相类似的皂苷等混杂在一起,如洋地黄叶中含洋地黄皂苷(digitonin),而且同一植物又常含几个甚至几十个性质近似的强心苷,每一个苷又有原生苷、次生苷(提取过程中部分水解而成的苷)与苷元的区别,这些都增加了分离提纯工作的难度。所以用一般分离方法常要通过多次反复处理或色谱方法才能分离得到纯品。

四、强心苷的结构

强心苷由苷元与糖原组成,苷元有时易受酸或酶异构化,糖原则容易遭酸或酶水解,由于许多植物本身就含有产生酶解或异构化的酶,因此过去文献对同一植物中分得的苷经常出现相互矛盾的报道。现在这些问题已经阐明,现分别按糖原与苷元阐明结构。

(一) 强心苷的糖原

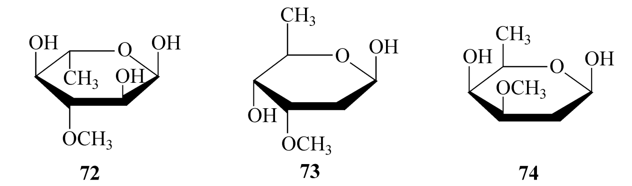
大多数强心苷可用下列通式表示(R 表示苷元,D 表示脱氧糖):

1) R—O—(D—O—)$_{1\text{-}3}$—(末端葡萄糖—O—)$_{1\text{-}2}$—H;

2) R—O—(D—O—)$_{1\text{-}3}$—H;

3) R—O—(末端葡萄糖—O—)—H 。

由上面通式可见苷元如同时接有脱氧糖与葡萄糖,则脱氧糖总是直接与苷元相连,而后再接葡萄糖。也有的仅接脱氧糖或葡萄糖。与其他植物成分的苷不同,强心苷除含有常见的葡萄糖、鼠李糖等以外,经常含有许多特有的脱氧糖。到目前为止,已发现的强心苷中所有脱氧糖都是甲基己糖(hexomethylose,即 6-脱氧糖或甲基五碳糖)或 C-3 羟基甲基化,或 C-2 还原糖(2-脱氧甲基己糖、2,6-二脱氧糖、2-脱氧甲基戊糖)或两种变化同时出现,也有一些糖原上连有乙酰基,常见的脱氧糖除表 16-2 已列举过的洋地黄毒糖与加拿大麻糖与 L-夹竹桃糖外,还有 L-黄夹糖(thevetose,**72**)、D-沙门糖(sarmentose,**73**)及 D-地芰糖(diginose,**74**)等多种。



72　**73**　**74**

(二) 强心苷的苷元

强心苷苷元的甾体骨架 C-17 位连有不饱和五元或六元内酯环,均为 β-型;C-3 OH 大多为β-型,连有六碳糖;C-10 大多为甲基,少数为 CH_2OH 或 CHO,均为β-型。此外,还含 1~ 3 个羟基,一般位于 C-3、C-14、C-16 等位,少数化合物 C-5 也有羟基。A/B 环大多为顺式,B/C 环为反式,C/D 环为顺式。

R=CH_3,CH_2OH,CHO

在碱水作用下内酯开环,加酸后又闭环。如果用醇碱开环,加酸后不能还原,而重排成异构体,双键先从α,β-位移至β,γ-位,再与 C-14 OH 连成环醚(**75**)。

NaOH / MeOH　　H^+

75

有时植物中除含酶解苷的酶外,还含有使苷异构化成无生理作用的别式(allo-form)强心苷的酶,这时它的 C-17 上的内酯环是α-位,在醇碱作用下它不产生上述环醚的异构体。由此也旁证了 C-17 内酯环与 C-14 羟基为顺式,均为β-型。

双不饱和六元内酯环同样能为碱开环,酸闭环还原,而在醇碱作用下则生成酯(如用甲醇则成甲酯),游离出来的烯醇再脱水并与 C-14 羟基环合成氧环化合物的异构体(**76**),同时失去生理活性。反应如下

NaOH / MeOH

76

五、强心苷结构的波谱

(1) UV

含α,β不饱和γ-内酯环的强心苷在紫外光谱中显示λ_{max}为 220nm 的强吸收峰,而含α,β,γ,δ不饱和 δ-内酯环的强心苷在紫外光谱中显示 300nm 的强吸收峰。

(2) IR

如果用 KBr 压片测定,强心苷及苷元的红外光谱除指纹区的一般吸收峰及ν_{max}为 3500cm^{-1}附近的羟基吸收峰外,在 1600~ 1800cm^{-1}区内由不饱和γ-内酯环显示 1720cm^{-1}、1780cm^{-1}两个强吸收峰,双不饱和 δ-内酯环显示 1718cm^{-1}、1740cm^{-1}两个强吸收峰。化合物含乙酰基时,如夹竹桃苷元(**67**)或毛花洋地黄苷乙与苷丙所含的乙酰洋地黄毒糖在 1760cm^{-1}附近多一个乙酰基吸收峰。酰基化合物,如毒毛旋花素 K_4,则在 1725cm^{-1}附近增加了一个酰基吸收峰。

(3) ^{1}H-NMR

大多数强心苷苷元(以 C_5D_5N 为溶剂)于 δ 1.00ppm 附近显示两个叔甲基单峰信号。其中 C-18 甲基比 C-19 甲基为低。C-3 质子信号位于 δ 3.50ppm(多峰)附近,如果与糖连接成苷,则向低场移动 0.2ppm 以上。C-19 甲基为醛基取代时,如化合物 **66**,则于 δ 10.00ppm 附近显示醛基质子信号(单峰)。苷元 C-17 质子信号位于 δ 2.80ppm 附近(多峰),它与 C-16 两个质子(δ 2.50ppm 附近)信号相偶合。γ-不饱和内酯环的烯质子信号位于 δ 5.80ppm 附近,而其亚甲基信号位于 δ 4.8ppm与 δ 5.1ppm(各为双峰 J = 12Hz)。δ-不饱和内酯环 3 个质子信号位于 δ 5.00~6.00ppm 附近,双峰,J 值根据 C-2′位质子情况而定,两个直立键偶合(如葡萄糖) J = 6~8 Hz,如果为两个平伏键偶合(如鼠李糖) J = 1~2Hz。鼠李糖甲基信号位于 δ1.50ppm 附近,双峰,J = 6Hz。同时可由端基质子的数目测定苷所带糖的数目。

(4) ^{13}C-NMR

大多数苷元甾体母核与常见糖的^{13}C-NMR 数据可从参考书中找到。比较时一定要写上测定的溶剂,现列出化合物 **70** ~ **74** 糖原(甲基糖)与强心苷元(**63** ~ **66**)的^{13}C-NMR 数据于表 16-3 和表 16-4[36]。

表 16-3　化合物 70~74 的甲基糖的^{13}C-NMR 数据

部位	70	71	72	73	74
C-1′	97.6	95.9	98.9	97.3	98.2
C-2′	36.4	35.8	73.8	33.6	33.1
C-3′	78.7	79.3	84.8	80.3	79.1
C-4′	74	77.1	76.6	67.9	67
C-5′	71.1	69.1	68.9	69.9	71.2
C-6′	18.9	18.6	18.5	17.5	17.6
OCH_3	58.1	56.9	60	56.7	55.1

表 16-4　化合物 63~66 苷元的^{13}C-NMR 数据

C	63	64	65	66	C	63	64	65	66
1	30	30	30	24.8	13	50.3	50.4	56.4	50.1
2	28	28	27.9	27.4	14	85.6	85.2	85.8	85.3
3	66.8	66.8	66.6	67.2	15	33	42.6	33	32.2
4	35.5	33.5	33.3	38.1	16	27.3	72.8	27.5	27.5
5	35.9	36.4	36.4	75.3	17	51.5	58.8	46.1	51.4
6	27.1	27	26.9	37	18	16.1	16.9	9.4	16.2
7	21.6	21.4	21.9	18.1	19	23.9	23.9	23.8	195.7
8	41.9	41.8	41.3	42.2	20	177.1	171.8	177.1	177.2
9	35.8	35.8	32.6	40.2	21	74.5	76.7	74.6	74.8
10	35.8	35.8	35.5	55.8	22	117.4	119.6	117	117.8
11	21.7	21.9	30	22.8	23	176.3	175.3	176.3	176.6
12	40.4	41.2	74.8	40.2					

(5) MS

强心苷的质谱比较复杂,苷元的分子离子峰较弱,特征峰较少。一般除分子离子峰外,还出现 M－18、M－36 等去羟基质子碎片峰。

六、毛花洋地黄毒苷

人们最早研究的是紫花洋地黄(*Digitalis purpurea*),从其叶中曾先后分离得到强心有效成分紫花洋地黄毒苷甲、苷乙及其他强心苷 30 种以上,以后发现毛花洋地黄(*Digitalis lanata*)叶强心作用比紫花的强 4 倍,进一步的研究发现它们的区别在于毛花洋地黄苷甲与乙比紫花洋地黄毒苷甲、苷乙在它们的第三个洋地黄毒糖 C′-3 位多一个乙酰基。此外,它还含有毛花洋地黄叶中特有的毛花洋地黄毒苷丙(lanatoside C,**77**),而且是主要成分,同时它作用快,排泄快,因而很快代替了紫花洋地黄的地位。

77

毛花洋地黄苷甲、苷乙与苷丙的糖原相同,区别在于苷元有不同的羟基取代。苷甲的 C-12 位无羟基(**63**)、苷乙的 C-16 位有羟基(**64**)、苷甲、苷乙的强心作用均远较苷丙为弱[35,36]。

毛花洋地黄毒苷丙的苷元特点是 C-12 位有一个 β-OH 基,糖原部分与苷甲、苷乙相同,在 C-3 β-位上连有 3 个洋地黄毒糖(其中第三个毒糖 C′-3 位有乙酰基)与一个末端葡萄糖,所有糖都是 1→4 位连接。第三个洋地黄毒糖的乙酰基不很稳定,很容易被稀碱水解下来,市售的西地兰强心药,比较稳定,且溶解度较大,常制

成针剂供急救用,起作用时间 20~ 45min。如果将其末端葡萄糖用植物本身的酶或其他酶水解掉,则为市售的地高辛,它作用较缓慢(起作用时间 1~ 2h)而持久,常制成片剂供心脏病患者日常服用。二者都用以治疗急慢性充血性心力衰竭、心房纤维颤动等症。

西地兰容易溶于甲醇,微溶于乙醇与水,不溶于氯仿与乙醚。地高辛因少一个葡萄糖,其溶解度较大,可溶于稀乙醇、吡啶及氯仿与乙醇的混合液中,但不溶于氯仿与乙醚。

西地兰与地高辛的提取与分离。这里介绍我们于 1971 年与药厂协作研制的一种比较经济而简便的方法。

(一) 西地兰的提取

将生药叶磨粉后加 5 倍量 70% 乙醇于 60℃搅拌加热 2h, 过滤,滤渣再用 3 倍量 70% 乙醇提取 2 次。提取液合并,减压浓缩到含醇量为 15%~ 20%,冷却,布袋过滤,滤液减压浓缩到相当于生药量为止,用 1/3 量氯仿洗涤 1 次,水液加乙醇使含醇量为 22% 左右,氯仿提取 3 次,每次氯仿用量均为稀醇液的 1/3。提取液合并,减压蒸干至残留物为疏松状。加入少量甲醇及水(10g 总苷加 3~ 5mL 甲醇及 0.25mL 水),使析出毛花洋地黄苷甲、苷乙、苷丙混合苷结晶,加丙酮-乙醚(1∶1)混合液后过滤、洗涤、烘干。

干燥叶粉 —70%乙醇 60℃热提→ 乙醇液 —减压浓缩至含 20%乙醇→ 浓缩液
—放冷,过滤,去胶→ 滤液 —继续减压浓缩→ 浓水液 —氯仿洗涤→ 浓水液
—加乙醇至水液含 22%醇→ 稀醇液 —氯仿提取→ 氯仿液 —回收氯仿→ 残留物
—加少量甲醇及水析混合苷结晶→ 混合苷 —甲醇、氯仿、水分配→
→ 氯仿层(主要为甲、乙苷)
→ 水层 —浓缩至结晶析出→ 结晶(苷乙、苷丙) —再次用甲醇、氯仿、水分配→
水层 —浓缩过滤→ 苷丙 —于甲醇中加 $Ca(OH)_2$→ 西地兰

毛花洋地黄苷丙的纯化:混合苷、甲醇、氯仿、水按 1 ∶ 100 ∶ 500 ∶ 500 比例,使混合苷先溶于甲醇,过滤,滤液加氯仿与水振摇,静置分层,氯仿层主要含甲、乙苷,水层主要为乙、丙苷。取水层减压浓缩至少量,放冷,即析出乙、丙混合苷粉末,过滤后再按上述比例重复一次,所得的水层浓缩后即得苷丙。氯仿层中的甲、乙苷另行处理。

苷丙脱乙酰基:取苷丙 3g,溶于 5 倍量甲醇加等量新鲜配制的 0.15% 氢氧化

钙水溶液,放置室温过夜,次日如 pH 为 7.0(否则,加 1% HCl 调至中性),即减压浓缩至少量,析出西地兰结晶,甲醇重结晶,溶点 265℃ (分解)。

(二) 地高辛的提取

干燥叶粉加等量水拌匀,保持 40~50℃发酵酶解 20h 左右,每两三小时翻动 1 次,然后分别用 4 倍及 3 倍量 80% 乙醇回流搅拌提取 2 次,每次 2 h,冷却,过滤,滤液合并减压浓缩到约含 20% 乙醇,放冷,析出叶绿素等胶质,用布袋滤取上层清液,滤液用氯仿提取 3 次,每次用量为水液的 1/5。合并氯仿液,浓缩到生药量 1/5 左右,用 10% 氢氧化钠水液洗涤数次,每次为氯仿的 1/10,以脱去乙酰基,并去除残留叶绿素等杂质,至碱液基本无色为止。最后用 1% 氢氧化钠溶液洗 1 次,再用水洗到中性,将氯仿液蒸干,所得残留物用少量丙酮溶解,静置过夜。析出的地高辛用 80% 乙醇(并加少量活性炭脱色),重结晶一两次,即得纯品。流程如下:

$$\text{干燥叶粉}\xrightarrow[\text{40℃ 发酵}]{\text{加等量水拌匀}}\text{药粉}\xrightarrow{\text{80\% 乙醇热提}}\text{醇提液}$$

$$\xrightarrow[\text{过滤、去胶}]{\text{减压浓缩到含 20\% 乙醇}}\text{稀醇液}\xrightarrow{\text{氯仿提取}}\text{氯仿液}\xrightarrow{\text{浓缩}}$$

$$\text{浓氯仿液}\xrightarrow[\text{水洗}]{\text{碱水洗涤}}\text{浓氯仿液}\xrightarrow{\text{回收氯仿}}\text{残留物}\xrightarrow[\text{析出结晶}]{\text{加丙酮}}$$

$$\text{粗地高辛}\xrightarrow{\text{80\% 乙醇重结晶}}\text{地高辛}$$

如果用乙酸乙酯代替乙醇提取西地兰和地高辛,则所得产品较纯,纯化手续更简便,得率也较高,但是用乙醇经济安全,所以常为中国工业上采用。

这里洋地黄毒糖上的乙酰基在碱液洗涤过程中已水解掉,最后所得的次生苷总苷,可利用植物中所含各种苷在 80% 乙醇中的溶解度不同(洋地黄毒苷容易溶,地高辛次之,羟基洋地黄毒苷难溶)反复重结晶纯化。

参 考 书 目

[1] 徐任生, 叶阳, 赵维民. 天然产物化学(第二版). 北京:科学出版社, 2004

[2] 林启寿. 中草药成分化学. 北京:科学出版社, 1977

[3] 徐任生, 陈仲良. 中草药有效成分的提取与分离(第二版). 上海:上海科技出版社, 1982

[4] Stoll A, Jucker E. Herzglykoside in Modern Methoden der Pflanzenanalyse(3rd ed). Berlin: Springer-Verlay, 1955~1961

[5] Dean F M. Naturally Occuring Oxygen Ring Compounds. London, New York:Butterworth, 1963

[6] 龚运淮. 天然有机化合物的核磁共振化学位移. 昆明:云南科学出版社, 1986

[7] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用. 北京:科学出版社, 1987

参 考 文 献

[1] Stoll A et al. Helv Chem Acta, 1949, 32:197
[2] Freeman G et al. J Sci Food Agr, 1975, 26:1869
[3] Calvey E M. J Chromatography Sci, 1994, 32:93
[4] 张学俊等. 中国调味品, 1996, 10:24
[5] 郎宜江等. 中草药, 1981, 12:4
[6] 张绍华. 天然产物与开发, 1997, 9:53
[7] Brion M. J Chem Soc, 1961:14
[8] Mutsh-Eckner M et al. J Chrom, 1992, 625:183
[9] 杨佩荣. 食品工业科技, 2000, 21:63
[10] Dong Y et al. J Cancer Res, 2001, 61:2923
[11] Clement I P. J Nutr, 1998, 128:1845
[12] Spare C G et al. Acta Chem Scand, 1961, 15:1280
[13] Virtanen A I. Angew Chem Internat, 1962, Edit 1, (6):299
[14] Hegnauer R. Chemotaxonome der Pflanzen Ⅱ, 1963:320
[15] 唐宗俭等. 中国科学, 1974, 1:16
[16] Ettlinger M G et al. J Am Chem Soc, 1956, 78:4172
[17] Waser J et al. Nature, 1963, 198:1297
[18] Elliot M C. Phytochemistry, 1970, 9:1629
[19] Friis P. Acta Chem Scand, 1996, 20:698
[20] Schwartzmaier U. Chem Ber, 1976, 109:3250
[21] Moertel C G et al. N Eng J Med, 1982, 306:201
[22] Herbert V. Am J Clin Nutr, 1979, 32:1121
[23] 方圣鼎等. 化学学报, 1982, 40:273
[24] Ukita T et al. Chem Pharm Bull, 1961, 9:43
[25] Tanimura A. Chem Pharm Bull, 1961, 9:47
[26] Nakajima K et al. Chem Pharm Bull, 1978, 26:3050
[27] Thakkar K et al. J Med Chem, 1993, 36:2950
[28] 陈毅平等. 中国医药工业杂志, 2000, 31:334
[29] Stoll M et al. Helv Chem Acta, 1947, 30:2019
[30] 陈望忠等. 化学通报, 1998, 2:44
[31] 王大升等. 化学通报, 1995, 53:909
[32] Kucuk O et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001, 10:861
[33] Sharma S K et al. Italian J Fd Sci, 1996, 8:107
[34] 孙庆杰. 食品与发酵工业, 1998, 2:47
[35] Stoll A. Helv Chim Acta, 1951, 34:1460
[36] Stoll A et a1. Helv Chim Acta, 1933, 16: 1049

第十七章　海洋天然产物

第一节　概　　述

人类目前栖息生活的地球上有 3/4 的面积是海洋。海洋不仅是地球万物的生命之源,也是地球上生物资源最丰富的领域。据报道,地球上生物物种的 15%(约 28 万种)生活在海洋中。这其中除了已为人类所熟知的鱼、虾、贝类等生物外,仅较低等的海洋生物物种(如海绵、珊瑚、软体动物等)就有 20 多万种。这些海洋生物虽不太为人类所熟悉,但它们在海洋生物食物链中占有重要的地位,起着关键的生态作用。不仅如此,由于海洋生态环境的特殊性(高压、高盐、缺氧、避光),使得各种海洋生物物种之间的生存竞争非常激烈。为了能在严酷的环境下进化生存,很多海洋生物在生命过程中代谢产生一些结构特殊、生物活性显著的小分子化学物质即次生代谢产物。这些化学物质的主要作用是防范潜在天敌的进攻,避免海洋微生物及浮游杂物的附着,以及物种之间的信息传递。近年的研究发现,由于海洋生物与陆地生物生存环境不同,海洋生物次生代谢产物生物合成途径和反应系统与陆地生物相比有着巨大的差异。海洋生物次生代谢产物与陆地生物相比有着更大的化学多样性。现代药理研究表明,很多海洋小分子化合物对人类多种疾病有着很好的疗效,从而引起化学家、生物学家、药理学家的极大兴趣。

世界上对海洋生物次生代谢产物的化学和生物功能的研究(海洋天然产物研究)始于 20 世纪 60 年代,在美国科学家的带领下,欧洲、日本及其他国家学者相继开展了海洋生物化学、生物学、生态学等多方面的基础研究和针对人类重大常见疾病如肿瘤、心血管疾病的应用基础研究。在 40 多年时间里,海洋天然产物研究取得了飞速迅猛的发展,成为当前国际上一个生机勃勃的新兴学科和热点研究领域。40 年来,科学家已从海洋植物、无脊椎动物等海洋生物中发现了近 2 万种海洋天然产物。其中结构新颖、具有多方面显著生物活性和重要应用前景的海洋生物分子有数百种。

海洋天然产物化学作为一门以低等海洋生物(包括动、植物、微生物等)为研究对象的新兴学科,它的研究内容大致可归纳为三个方面:海洋毒素、海洋小分子次生代谢产物及其生化药物和海洋化学生态学。

海洋天然产物化学与其他学科的关系从一开始便十分密切,并且各个学科之间一直相互渗透、关联、影响。早期的海洋天然产物化学的研究沿袭和借鉴了植物化学和昆虫生态化学的研究方法和方向,主要以传统的化学手段确定化合物的结

构。由于海洋天然产物分子骨架往往十分奇特、新颖、复杂，而且化合物在生物中的含量、得率很低，从而给结构解析、确定带来了相当大的困难，所以开始阶段的研究进展相当缓慢。只是到了 20 世纪 80 年代，样品采集、储藏、鉴定，色谱分离纯化，波谱结构解析等高新技术的出现和普遍应用，特别是各种高分辨质谱、高分辨核磁共振技术的迅猛发展，给海洋天然产物的研究带来了极大的推动，使得原来极为困难复杂、耗时耗钱的海洋天然产物结构研究工作变得相对简单，目前甚至不足 1mg 的微量样品的复杂结构都能得到确定。新化合物的纯化与鉴定不再是海洋天然产物研究的障碍。分子水平的生物活性筛选模型及高通量筛选技术的建立，为其生物学活性的发现跟踪提供了技术保障，从而使海洋天然产物研究的高效、精细、目标化和生态化成为可能。由此，以生物活性为先导的对于海洋生物化学成分的研究揭开了新的篇章。

海洋天然产物研究的范围主要包括海洋植物、低等无脊椎动物和微生物三大种群。由于生态环境的巨大差异，海洋生物的次生代谢产物无论结构还是生理功能均与陆地生物有很大不同，主要表现为分子骨架的重排、迁移和高度氧化，分子结构庞大、复杂、分子中手性原子多。海洋化合物的类型包括萜类、甾体、生物碱、多肽、大环内酯、前列腺素类似物、聚多烯炔化合物、聚醇/聚醚等。海洋次生代谢产物往往结构中含有一些独特的化学官能团。例如，多卤素取代的化合物；含硫甲胺基的化合物；含腈基、异腈基、异硫腈基的倍半萜和二萜等。许多化合物，如以 má eganedin(**1**)[1] 为代表的大环二胺类海洋生物碱的生物合成途径至今仍不清楚。一些著名的海洋天然产物如短裸甲藻毒素(brevetoxin B, **2**)[2]、沙海葵毒素(palytoxin, **3**)[3] 和草苔虫内酯(bryostatin 1, **4**)[4] 都是通过化学手段结合波谱技术(包括单晶-X 射线衍射)成功确定结构的范例。

1　　**2**

许多海洋化合物显示多种多样的生物活性,其中以抗炎和细胞毒性尤为突出。美国是世界上最早开展海洋药物研究的国家。美国国立卫生研究院(NIH)癌症研究所(NCI)每年投于海洋药物研究的科研经费占全部天然药物研究经费的一半以上,他们的巨大投入已获得丰厚的回报。仅目前正在NCI进行临床疗效评价的海洋抗癌药物就至少有6个。例如,ecteinascidin 743 (**5**)[5]、dolastatin 10 (**6**)[6]、halichondrin B (**7**)[7]等。此外,还有一些很有前景的海洋药物候选物正在进行临床前研究。海洋生物活性物质不仅对治疗癌症,而且在治疗其他多种疾病方面也具有巨大的潜力和美好的应用前景。例如,加勒比海的一种柳珊瑚 *Pseudopterogorgia elisabethae* 中发现的活性成分 pseudopterosin A (**8**)[8] 具有很强抗炎活性而被用于皮肤过敏性疾病的治疗。以上列举的几个例子仅只是NIH公开报道的。

事实上,还有很多海洋药物正处于临床研究的不同阶段。

6

7　　**8**

海洋生物似乎能提供无穷尽的新化合物,尤其是近年来,随着相关分析手段的提高和新生物活性筛选模型的发展,海洋生物中新化合物发现的速度和数量均超出了人们的想像,且不断有全新骨架的海洋化合物被报道[9]。这些研究成果极大地丰富了有机化学的内容,促进了有机化学、药理学、分子生物学等相关学科的发展。虽然海洋化合物的数量增长很快,但只占到了陆地生物中发现化合物数量的10%,从已研究的生物资源数量上来看,目前已被测定过的海洋生物只有几千种,由此可见海洋生物的开发与研究具有巨大的潜力和发展空间。

限于篇幅,本章将按海洋生物分类学的划分,着重对几类主要海洋生物的化学成分和相关生物活性研究分别加以归纳和介绍,力争能使读者对海洋天然产物的研究概况有一个全面清晰的了解和总体把握。

第二节　海 洋 植 物

一、红树林植物

海洋植物主要包括维管植物和海藻,是一类最早被研究的海洋生物。海洋维管植物涵盖了蕨类植物门、裸子植物门和被子植物门三个大的种群。有化学研究报道的海洋植物基本都属于被子植物门,近年来,对双子叶植物纲红树林植物的研究十分活跃。

红树林植物是专一生长于潮间带的木本植物,全球有 24 科、38 属、84 种,分布于南北纬 32°之间的热带和亚热带海岸[10]。红树林植物的化学成分主要包括倍半萜、二萜、三萜、甾体、生物碱、鞣质、黄酮、木脂素和环硫醚等[11]。红树林植物中的二萜均为植物二萜中的常见骨架,包括半日花烷(labdane)二萜、开环半日花烷(secolabdane)二萜、瑞香(daphnane)二萜及类贝壳杉烷二萜(kaurane)等。在对红树林植物化学成分研究的过程中,我们小组从采自中国广西的大戟科植物海漆(*Excoecaria agallocha*)中不但得到了贝壳杉烷型二萜,还发现了异海松烷型(isopimarane)二萜(**9**)以及开环的 atisane 型二萜(**10**)[12]。最近,从楝科植物木果楝(*Xylocarpus granatum*)中发现的柠檬苦素类三萜化合物 xyloccensin O (**11**)和 P (**12**),丰富了红树林植物中三萜化合物的骨架;化合物的结构得到 X 射线衍射实验的证实[13]。

9　**10**　**11** R = H　**12** R = OAc

环硫醚为红树林植物中一类较特殊的成分,目前仅发现于红树科的 *Bruguiera* 属植物。从采自中国广西的木揽(*B. gymnorhiza*)中,我们发现了一个 15 元大环硫醚 gymnorrhizol (**13**),该化合物具有一个罕见全新的分子骨架。由于该分子是一个柔性结构且高度对称,给结构鉴定带来了极大挑战。该化合物的结构在波谱解析的基础上,最终通过 X 射线晶体衍射实验得到确定[14]。尽管该化合物结构看上去与 Kato 早期从同属植物 *B. conjugana* 中得到的简单硫醚化合物 brugierol (**14**)、isobrugierol(**15**) 和 brugine(**16**)[15] 相去甚远,但它们之间具有密切内在的生源关系是显而易见的[14]。体外活性筛选中,gymnorrhizol (**13**) 对Ⅱ型糖尿病的一个重要靶标分子——蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B(PTP 1B)显示抑制活性,其 IC_{50} 值为 7.95μg/mL。

13　**14** X = O, Y = lone pair　**15** X = lone pair, Y = O　**16**

二、海藻

海藻是人们认识最早的海洋生物之一,共有 8000 多种,其中可被食用的有 100 多种。海藻可以分成红藻门、褐藻门和绿藻门三个种群,近年来的化学研究对各个种群均有涉猎,但总体上的研究报道比前几年显著下降。

海藻中的化学物质包括多糖、脂类、甾体、萜类、胡萝卜素、多肽和含氮化合物等几大类。除多糖外,海藻中的次生代谢产物以萜类化合物最为丰富,特别是倍半萜和二萜,其种类之多、数量之大为其他海洋生物所不及。海藻中的萜类化合物中经常会有卤素取代基团;同时,由于海藻的体内生物合成存在异戊二烯和聚丙烯的混合途径,所以经常会出现聚丙烯结构取代的萜类化合物或二者的骈合体。

(一) 红藻门

红藻是海藻中数量最多的一个群体,全球约有 558 属,近 4000 种。红藻中的次生代谢产物主要有脂类、苯衍生物、生物碱、甾体和萜类等。红藻化合物的最大特点是分子中多具有卤素或多卤素取代,其最具代表性的结构类型是萜类化合物,特别是倍半萜化合物。近年来,对红藻门凹顶藻属中的倍半萜化合物的研究最为活跃。据不完全统计,凹顶藻属中倍半萜的结构骨架达 25 种之多(图 17－1, calenzane 至 cyclococane)[16],这些化合物中有一些成分显示出强烈的抗菌和细胞毒性。

恰米烷型(chamigrane)倍半萜是凹顶藻属中含量最多、变化最丰富的一类倍半萜。早期发现的一些化合物如 elatol (**17**)、[1(15)*Z*, 2*Z*, 4*R*, 8*S*, 9*R*]-8, 15-dibromochamigr-1(15), 2, 11(12)-trien-9-ol (**18**)、[1 (15) *E*, 2*Z*, 4*R*, 8*S*, 9*R*]-8, 15-dibromochamigr-1(15), 2, 11(12)-trien-9-ol (**19**) 、isoobtusadiene (**20**)等,对 P-388、A-549、HT-29、MEL-28 四种肿瘤细胞株均显示很强的细胞毒活性,其 IC_{50} 值均低于 1.0μg/mL,有的甚至达到了 0.025μg/mL[17]。月桂烷型倍半萜是凹顶藻属中发现较早的一类倍半萜,从中国东海的岗村凹顶藻(*Laurencia okamurai*)中,我们也发现了该类化合物的存在(**21** ~ **24**)[18];由日本的同种凹顶藻中发现的同类化合物 laurinterol (**25**) 和 iso-laurinterol (**26**)对海洋细菌 *Alteromoas* sp. 、*Azomonas agilis*、*Erwinia amyiovora* 和 *Escherichia coli* 显示强烈的抑制活性[19]。

17　　**18**　　**19**　　**20**

R₁/R₂ structures:

21　R_1 = OOH，R_2 = Br

22　R_1 = R_2 = Br

23

24

25

26

calenzane　aromadendrane　bisabolane　brasilenane　cadinane　humulane　poitane

chamigrane　cuparane　laurane　germacrane　guaiane　maaliane　pannosane

guimarane　oppositane　aristolane　perforane　farnesane　eudesmane　perforatane

rhodolaurane　3, 6-cycloprecapnellane　subergane　cyclococane　isodaucane　cadinane　caryophyllane

suberosane　africanane　dysetherane　reticulidane　bolinaquiane　friedodrimane　drimane

capnellane　illudalane　pallescensane　nakafurane　farnesane　lemnaleane　austrodorane

axane　lindenane　furodysane　furodysinane　cubebane　pupukeanane　spiroseaquiterpane

图 17－1　海洋生物中常见的倍半萜骨架

（二）褐藻门

褐藻是海藻中最小的一个种群，全球有1500多种。褐藻中的次生代谢产物涉及海藻化合物的所有类型，以二萜最为丰富多变。褐藻二萜主要显示抗氧化活性、抗菌活性和细胞毒性，其结构上的重要特点是分子中经常会出现聚丙烯结构的取代基团或二者的骈合体，这是由于海藻体内存在异戊二烯和聚丙烯的混合生物合成途径的缘故。

褐藻中的链状二萜多为不饱和结构；绝大多数的链状二萜与聚丙烯结构以C—C键形成类似于维生素E的结构复合体；聚丙烯的部分可以是苯酚也可以是苯醌，二萜部分则会出现双键的异构、氧化或环合等变化。从褐藻 *Cystoseira crinita* 中分离得到的一系列类似物（**27** ~ **30**）是这类化合物的代表；由于结构上的特殊性，这类化合物均具有强烈的抗氧化作用，其作用效果与维生素E类似。化合物**27**与**28**还对HM-02、HepG-2和MCF-7肿瘤细胞株显示细胞毒性，其作用强度与$\Delta^{6'}$双键的构型无关[20]。该类骨架的7,11-环合物（methoxybifurcarenone，**31**）具有广泛的抗菌活性[21]。

27

28

29

30

31

环状二萜包括20多个骨架,最常见的骨架都包括在4个骨架群中:与 xenicane 相关的骨架(图 17-2)、与 dolabellane 相关的骨架(图 17-3)、与 prenylgermacrane 相关的骨架(图 17-4)及与 isocopalane 相关的骨架(图 17-5)。

图 17-2　海洋生物中常见的二萜骨架(1)——xenicane 组

图 17-3　海洋生物中常见的二萜骨架(2)——dolabellane 组

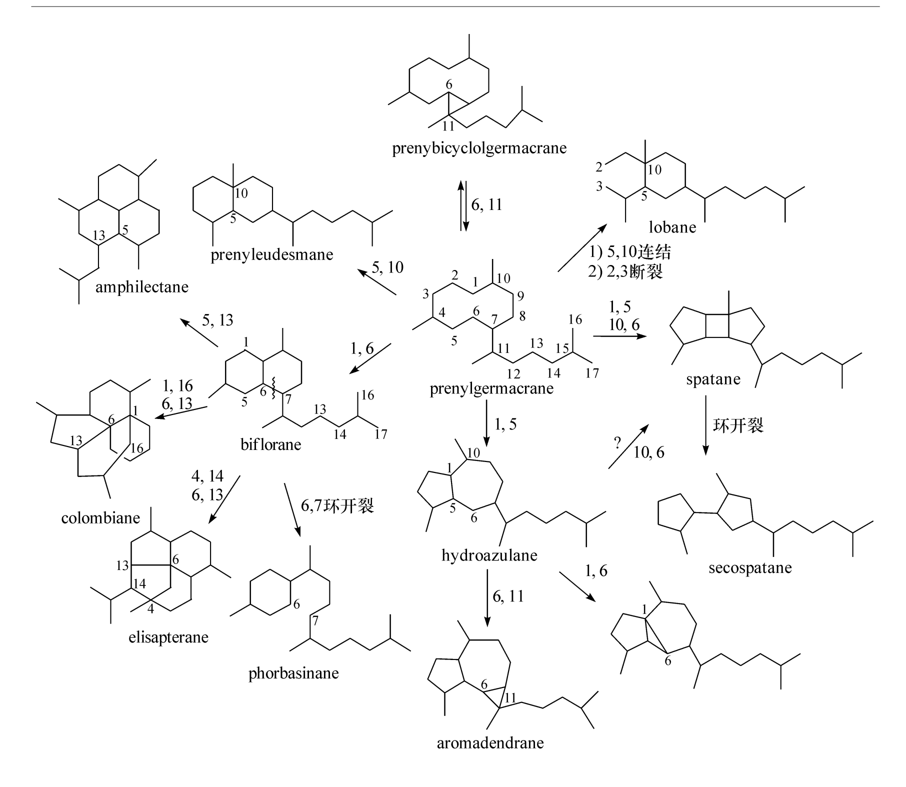


图 17-4　海洋生物中常见的二萜骨架(3)——prenylgermacrane 组

isocopalane　labdane　halimane　clerodane　hamigerane　sphenolobane

图 17-5　海洋生物中常见的二萜骨架(4)

在众多的环状二萜中，hydroazulane 二萜和 dolastane 二萜是两种较为常见的骨架。Amijitrienol(**32**)和 14-deoxyisoamijiol(**33**)是从褐藻 *Dictyota linearia* 中发现的 dolastane 二萜，对细菌 *Staphylococcus aureus* 和 *Mucor mucedo* 显示中等抑制活性[22]。Hydroazulane 二萜(**34** ~ **37**)由褐藻 *Cystoseira myrica* 中分离得到，它们对 KA3IT 肿瘤细胞株显示中等抑制活性[23]。

同维生素 E 同系物类似，isocoplane 二萜及其类似骨架的分子中，通常也连接有聚丙烯结构。从褐藻 *Stypopodium zonale* 中发现的有微管聚合抑制作用活性

的化合物 stypoldione (**38**) 对海鱼 *Eupomacentrus leucostictus* 有极强的麻醉作用,并能强烈抑制海胆受精卵的细胞分裂[24]。从同种海藻分离得到的类似化合物 **39** 则对酪氨酸酶显示抑制活性[25]。

32 **33** **34**

35 **36** **37**

38 **39**

(三) 绿藻门

绿藻的数量介于褐藻和红藻之间,但研究报道却是三种藻中最少的。绿藻中的化学成分涉及脂类、萜类、甾体、多肽、生物碱、胡萝卜素、苯类和黄酮等多种化合物类型。

绿藻中的萜类以链状或单环的倍半萜和二萜居多,偶尔会出现与苯丙素骈合的单萜结构,而且,苯丙素部分常有卤素取代。这类化合物多有较强的细胞毒性。分别来自绿藻 *Undota argenta*、*Tydemania expeditionis* 和 *Chilorodesmis fastigiata* 的二萜化合物(**40** ~ **42**)对细菌 *Staphylococcus aureus* 及 *Acillus subtilis* 均显示抑制活性;在 8μg/mL 时,对海胆受精卵的分裂均有抑制作用[26]。双吲哚生物碱色素 caulerpin (**43**)及其类似物是 *Caulerpa* 属绿藻的特征化合物;80% 的 *Caulerpa* 属绿藻中含有这类化合物。*Caulerpin* 能刺激莴苣根的生长,其活性与异植物生长素吲哚乙酸相似[27]。

绿藻中的多肽化合物均来自 *Bryopsis* 属绿藻。环肽 kahalalide F (**44**) 体外显示强烈的抗肿瘤、抗病毒和抗真菌等多种生物活性,其有效作用浓度均达到了 ppm[28]。研究发现,结构中 Val-3 和 Val-4 的立体构型对其活性至关重要[29]。目前,该化合物已作为抗前列腺癌药物进入 I 期临床。

40

41

42

43

44

第三节　海洋低等无脊椎动物

海洋低等无脊椎动物是海洋天然产物研究最重要的领域，也是海洋生物最重要的组成部分。目前研究最活跃的动物涉及腔肠动物门、多孔动物门、软体动物门、棘皮动物门以及分布于其他群体的动物。

一、腔肠动物门

腔肠动物门研究的主要对象是珊瑚虫纲的八放珊瑚亚纲，集中在柳珊瑚目和软珊瑚目；对其他动物也略有涉及。

(一) 柳珊瑚目

柳珊瑚俗称海扇或海鞭,生长在从潮间带到深达 4000m 的海洋中,广泛分布于从亚热带到两极的世界各海域中。对柳珊瑚的化学成分研究主要集中在 *Pseudopterogorgia* 属、*Briareum* 属、*Eunicea* 属、*Erythropodium* 属、*Eunicella* 属、竹节柳珊瑚属(*Isis*)以及软柳珊瑚属(*Subergorgia*),对其他种属也有涉及。其次生代谢产物大体可分为脂类、萜类和甾体[30]。

柳珊瑚中典型的脂类物质是前列腺素类似物。1966 年,前列腺素类似物 ancepsenolide (**45**)从加勒比海的柳珊瑚 *Pterogorgia anceps* 中的发现,引发了人们对于海洋天然产物的极大兴趣,标志着海洋天然产物化学研究的正式兴起[31]。有意思的是,从同一地点的同种珊瑚中,我们得到的是 ancepsenolide 的 3 个新类似物,却没有发现通常作为该种珊瑚主要脂类成分的 ancepsenolide[32]。甾体化合物是柳珊瑚中重要的次生代谢物质,其多样性表现为 A 环的芳化,B 环、C 环、D 环的开裂、氧化以及不同的烷化侧链等。含有 C-22 位缩酮结构的甾体 hippurin-1 (**46**)是粗枝竹节柳珊瑚(*Isis hippuris*)中的代表次生代谢产物[33];我们从中国海南网状软柳珊瑚(*Subergogia reticulata*)得到的 suberoretisteroids A (**47**)及其类似物均含有罕见的 C-24 位缩酮结构,化合物的结构由波谱学方法确定,并得到 X 射线衍射实验的证实[34]。从同一海域采集的粗疣棘柳珊瑚(*Acanthogorgia vagae*)中,我们还意外地发现了 6 个 19-羟基甾体,这是首次从柳珊瑚中发现 19-羟甾化合物,这些化合物极有可能是柳珊瑚生物合成去 19-甲基甾体的中间体[35]。

柳珊瑚次生代谢产物中变化比较丰富的是萜类化合物,主要是倍半萜和二萜。已发现的倍半萜化合物可分成六种骨架:愈创木烷(guaiane)、乌药烷(lindenane)、没药烷(bisabolane)邻苯醌、subergane、suberosane 和 caryophyllane(图 17-1)。著名的柳珊瑚酸(**48**)是 subergane 倍半萜的代表化合物,它在整体动物试验中显示神经毒性[36]。愈创木烷倍半萜是陆生植物中的常见骨架,但在海洋生物中却较为少见。我们从中国南海疣小月柳珊瑚(*Menella verrucosa*)发现了愈创木烷倍半萜内酯 meneverin A (**49**)及其类似物,这些化合物均具有罕见的 $\Delta^{4,14}$ 环外双键以及与α,β-不饱和 δ-丁内酯共轭的 $\Delta^{8,9}$ 双键;这类化合物的不稳定性给结构鉴定带来了极大困难,也阻碍了进一步的生物活性的测定[37]。

O O O 8 O H H

45

HO O 22 HO C D O AcO A B HO

46

47 **48** **49**

柳珊瑚中的二萜可依照生源划分为两组：由 prenylgermacrane 衍生的二萜(图 17－4)和由西松烷(cembrane)衍生的二萜 (图 17－6)。西松烷(cembrane)及其衍生的 briarane、eunicellane、secoeunicellane、cyclobutenbriarane、erythroane、aquariane、pseudopterane、gersolane 等二萜骨架是组成柳珊瑚大环二萜成分的主体。其中，Briarane 二萜是柳珊瑚中最具代表性的二萜骨架，多显示细胞毒性。发现于 *Briareum asbestinum* 的 briarein A (**50**)是该类骨架的第一个化合物[38]。由中国台湾的同属柳珊瑚 *B. excavatum* 中发现的 excavatolide M (**51**)对 P-388、KB、A-549 及 HT-29 细胞株均显示强大的细胞毒性，它对 P-388 的 ED_{50} 值甚至达到了 0.001μg/mL[39]。灯芯柳珊瑚(*Junceella*)也是 briarane 型二萜的重要来源，我们发现中国南海脆灯心柳珊瑚 (*J. fragilis*) 中的次生代谢产物多为 briarane 二萜类似物[40]。近年来发现的新二萜骨架 cyclobutenbriarane、erythroane 和 aquariane 均是 briarane 的重排产物[41] (图 17－6)。Gersolane 二萜则可相互骈合形成二聚体[42]。

50 **51**

由 prenylgermacrane 衍生的骨架多为小环二萜，如 amphilectane、elisapterane、colombiane 及 biflorane 等。到目前为止，所有的小环二萜均发现于 *Pseudopterogorgia* 属珊瑚，这种现象进一步证明了它们在生源上的联系。Pseudopterosin A (**8**)是由加勒比海柳珊瑚 *P. elisabethae* 分离得到的 amphilectane 二萜葡萄糖苷，该化合物有着极强的消炎镇痛功能，其作用功效优于消炎痛[8]；美国 Nereus 制药公司正在对其进行临床前研究，而法国公司 Estee lauder 以此为基础已成功开发出一种新型化妆品添加剂并投入生产。

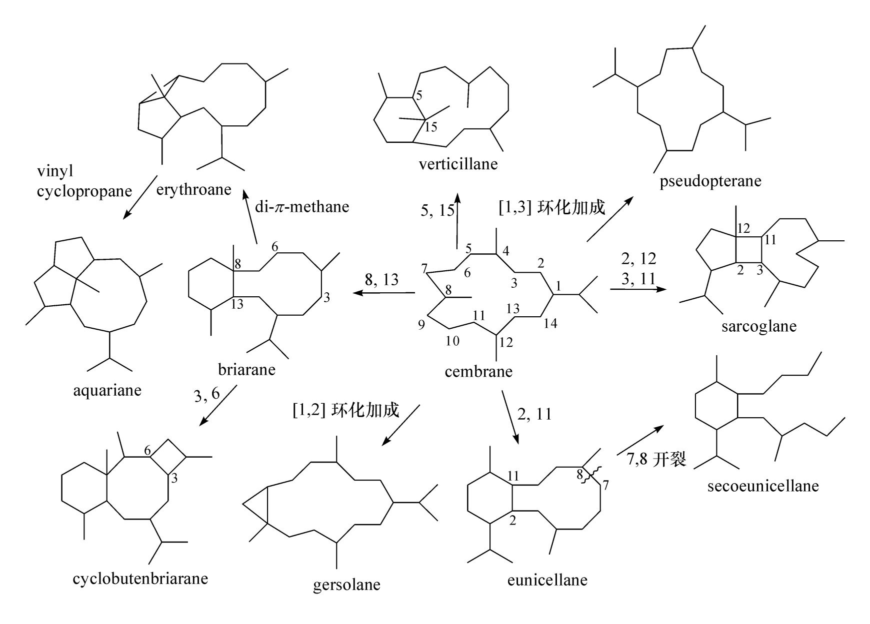


图 17－6　海洋生物中常见的二萜骨架(5)——cembrane 组

(二) 软珊瑚目

作为珊瑚家族的主要成员,软珊瑚可以分成 6 个科,有关化学成分及相关生物活性的研究主要集中在短指软珊瑚(*Simularia*)、豆荚软珊瑚(*Lobophytum*)、柔荑软珊瑚(*Nephthea*)、肉芝软珊瑚(*Sarcophyton*)及异花软珊瑚(*Xenia*)这五个属[30b,43]。

软珊瑚中富含萜类、多羟基甾醇和前列腺素等多种类型的化合物。软珊瑚中的前列腺素类似物虽然最初是从豆荚软珊瑚 *L. depressum* 中发现的[44],但主要存在于 *Clavularia* 属动物中。前列腺素类化合物 **52** ~ **54** 的分子中均具有卤素取代,其中化合物 **52** 对淋巴癌 MOLT-4、结肠癌 DLD-1 和肺癌 IMR-90 细胞株均显示显著的细胞毒性[45]。Tricycloclavulone (**55**) 和 clavubicyclone (**56**) 也属这类化合物,但具有新颖的骨架,后者对乳癌和卵巢癌有中等抑制作用[46]。

O　H　OAc　CO_2Me　R　OH

52　R = I
53　R = Br
54　R = Cl

AcO　H　O　H　CO_2Me　H　H　AcO

55

56　　　　**57**

58　R_1 = OH, R_2 = OAc

59　R_1 = OAc, R_2 = OH

60

软珊瑚中的甾体同样表现为高度氧化的多酮、多羟基形式,以及母核的开环和侧链的不同烷化等。从中国南海柔荑软珊瑚 *N. bayeri* 中,我们得到了结构新颖的多羟基甾醇 nanjiol A (**57**)及其系列类似物,这些化合物都含有 20-羟基和共轭的-4-烯-3-酮结构特征[47]。柔荑软珊瑚(*Nephthea*)和 *Litophyton* 属软珊瑚中的典型甾体化合物是 19-羟基甾体,海洋生物中的第一个 19-羟基甾醇就是从 *Litophyton* 属软珊瑚中发现的[48]。从中国的短指软珊瑚(*Simularia* sp.)中,我们发现了新的 19-羟甾类似物(**58**, **59**),这是首次从短指软珊瑚中发现该类化合物[49]。

倍半萜化合物除了常见的愈创木烷和呋喃倍半萜外,还含有 africanane、capnellane 和 illudalane 三种类型。Capnellane 型倍半萜是典型的海洋天然产物,主要存在于 *Capnella* 属软珊瑚,其代表化合物 **60** 对白血病瘤株 K-562 显示强烈的细胞毒性[50]。

二萜化合物包括西松烷、amphilectane、xenicane、新 xenicane、biflorane、lobane、aromadendrane、dolabellane、eunicellin、verticillane 和 sarcoglane 11 种骨架,这些骨架可以归纳为生源上相对独立的三个群体:xenicane 组(图 17-2)、prenylgermacrane 组(图 17-4)和西松烷(cembrane)组(图 17-6)。西松烷和 xenicane 型二萜是软珊瑚中含量较丰富的骨架。西松烷二萜在短指软珊瑚、豆荚软珊瑚、柔荑软珊瑚、肉芝软珊瑚和硬棘软珊瑚中(*Scleronephthya*)均有发现。从中国南海硬棘软珊瑚[51]及肉芝软珊瑚[52]中均发现了西松烷型二萜的存在。其中,从肉芝软珊瑚中得到的 sarcophytonolide C (**61**)具有罕见的 C-2~C-18 δ-丁内酯结构[52]。从短指软珊瑚 *S. gardineri* 中得到的 **62**,是西松烷二萜通过酯键形成的复合体,它对 P-388、A-549、HT-29 和 MEL-28 等肿瘤细胞株均显示拮抗活性[53]。西松烷二萜通过 C—C 键形成的二聚体类似物均发现于肉芝软珊瑚中,两分子间

的骈合似乎是通过 Diels–Alder 反应完成的。来自中国南海 *S. tortuosum* 的 methyl tortuoate A (**63**)是这类化合物的代表,它对人鼻咽癌瘤株 CNE–2 显示细胞毒性作用[54]。Xenicane 型二萜主要来自于异软珊瑚科的异花软珊瑚属,在柔荑软珊瑚属、*Eleutherobia* 属软珊瑚及亲缘关系较远的柳珊瑚目、蓝珊瑚目和褐藻中也有发现,这类二萜化合物具有抗炎、抗菌和抗肿瘤的作用。新 xenicane 二萜是从异花软珊瑚属发现的新骨架(图 17–2),而 verticillane 和 sarcoglane 两种骨架显然是由西松烷重排所得(图 17–6)。

61　　**62**　　**63**

(三) 六放珊瑚目

六放珊瑚目又称群体海葵目,群体,无骨骼,习惯上也归属为珊瑚虫纲六放珊瑚亚纲。对该生物群体的化学研究报道很少,只有一些甾体、脂类和生物碱色素从这类生物中被发现,但著名的海洋毒素沙海葵毒素(palytoxin, **3**)的发现却使得这类生物为人类所熟知。沙海葵毒素由腔肠动物沙海葵(*Palythoa toxica*)中分离得到,是一个结构庞大复杂的水溶性聚醇化合物,其分子式为 $C_{129}H_{221}O_{54}N_3$,分子中有 64 个手性碳原子和 7 个双键,可产生 2^{71} 个异构体。沙海葵毒素的结构测定历经 10 年才得以完成,这是综合运用光谱解析和化学方法确定复杂天然产物结构的一个成功典范,是当今天然产物化学的重大成果[3],而随后完成的对该化合物的全合成,则被认为是现代化学的重大进展[55]并直接影响了海洋天然产物及相关学科发展达 30 年之久。

沙海葵毒素是毒性最强的非蛋白毒素,其毒性比河豚毒素高 1 个数量级。它具有强烈的抗肿瘤活性,以 84 μg/kg 的剂量给药,就能 100 % 地抑制小鼠艾氏腹水瘤;它还是最强的冠状动脉收缩剂,其效能比血管紧张素 Ⅱ 高 100 倍以上。令人感兴趣的是它对离子通道通透性的作用机制与河豚毒素相反,能使钠离子(Na^+)通道开放。对于沙海葵毒素在化学、药理以及生命科学各领域的相关研究目前仍很活跃。

二、多孔动物门

多孔动物门又称海绵动物门,有动物 5000~ 10 000 种,可分为三类:钙质海绵、六星海绵以及韧带海绵。其中韧带海绵种类最多,分布最广。自然界的海绵往往存在共生现象[56]。

海绵中的化合物类型包括萜类、含氮化合物(生物碱、氨基酸、核苷类、神经酰胺、环肽等)、聚醚类、大环内酯、过氧化合物、聚烯炔烃类以及甾体等。这些次生代谢产物不但结构复杂、新颖,而且许多具有广谱或特异性的抗肿瘤、抗病毒、抗微生物以及抑制各种生物酶等生理活性。海绵是海洋生物中具有临床应用前景先导化合物的主要来源[57]。

海绵中的脂类包括甘油酯、磷脂、糖脂等物质,主要显示抗真菌和抗肿瘤活性。我们从红海的 *Hippospongia* 属一种海绵先后发现了 7 个链状异丁胺酸甲酯类似物 hurghamides A~ G,这是首次从海洋中生物中发现这种脂类化合物[58]。

海绵中的萜类包括倍半萜、二萜、二倍半萜和三萜。海绵中的倍半萜涉及杜松烷(cadinane)、桉叶烷(eudesmane)、橄榄烷(maaliane)、马兜铃烷(aristolane)、没药烷(bisabolane)、pallescensinane、nakafurane、spiroseaquiterpnane、aromadendrane、axane、isodaucane、furodysinane、furodysininane、dysetherinane、reticulidinane、farnesane、bolinaquiane、friedodrimane 及 drimane 等约 20 种骨架(图 17-1);常见的二萜包括约西松烷、半日花烷、phorbasinane、biflorane、amphilectane、sphenolobane、isocopalane、clerodane 以及 hamigerane(图 17-4、图 17-5、图 17-6)等 10 种以上的骨架。海绵倍半萜和二萜中普遍出现的异腈、异硫腈和甲酰胺基取代结构以及倍半萜与苯醌、苯酚的聚合体,这是其他动物中很少见的[9,59];同样,含有二氯亚胺取代的倍半萜也仅发现于海绵及捕食这些海绵的软体动物中[9,60]。海洋生物中的三萜代谢产物较为少见,但其结构多与陆地生物不同。海绵中的三萜主要是倍半萜的二聚体或二倍半萜的母核的延伸,结构中经常出现与聚丙烯结构的骈合体[61]。

二倍半萜是海绵中含量较为丰富的化合物,大致可分为长链二倍半萜、单环二倍半萜、双环二倍半萜、三环二倍半萜、四环二倍半萜以及五环二倍半萜等几种骨架。早期从加利福尼亚海绵 *Luffariella variabilis* 中得到的单环二倍半萜 manoalide (**64**)是第一个通过选择性抑制磷酸酯酶 A_2 发挥抗炎活性的化合物[62]。我们从红海一种未鉴定海绵中得到了一个类似的结构的二倍半萜 hurghaperoxide (**65**),其分子中具有罕见的过氧醚环结构[63]。从中国南海的海绵 *Hyrtios erecta* 中,我们还得到 scalarane 型二倍半萜 hyrtiosin A (**66**)及其类似物,其结构得到 X 射线衍射的确证[64]。Scalarane 型二倍半萜是海绵中最典型的四环二倍半萜,主要存在于 *Hyrtios* 属、*Cacospongia* 属、*Phyllospongia* 属、*Strepsichordaia* 属海绵以

及捕食这些海绵的软体动物中。从加勒比海掘海绵 *Dysidea etheria* 中得到的 dysidiolide (**67**)是第一个天然蛋白磷酸酶 cdc25 A 抑制剂,具有强烈的抗癌活性[65]。由印度尼西亚海绵 *Strepsichordaia aliena* 得到的 honulactone A(**68**)及其类似物是含有环丙烷的 27 碳五环二倍半萜,它们对瘤株 P-388、A-549、HT-29 和 MEL-28 均显示强烈的细胞毒性,其 IC_{50} 值均为 1μg/mL[66]。

海绵生物碱包括吡咯类、吲哚类、吡啶类、异喹啉类、溴代酪氨酸类、大环二胺类生物碱、胍基生物碱以及喹喏里西定生物碱等多种类型。Dragmacidin E (**69**)是从海绵 *Spongosorites* sp. 中提取分离出来的一种双吲哚生物碱,它具有抑制丝氨酸和苏氨酸的磷脂蛋白酶(PP1 和 PP_2 A)的作用[67]。来自海绵 *Amphimedon* sp. 的大环二胺类生物碱 máeganedin A (**1**)具有很强的抑菌作用以及抗肿瘤活性[1],这是海绵中最具代表性的生物碱类型。我们从地中海海绵 *Reniera sarai* 中曾得到 saraines A~ C、saraine-1、saraine-2 以及 isosaraine-1~ 3 等一系列大环二胺类生物碱,并用改进的 Mosher 法测定了其绝对立体构型[68]。从该属一种名未定的海绵中我们还得到了一个具有罕见的四环笼状母核全新骨架的大环二胺生物碱 misenine (**70/71**)。Misenine 在不同溶液 pH 下,会表现出不同的分子状态:碱性条件下,N-9 与 C-11 间会形成类似共价键的结合,C-11 表现为仲醇碳的性质(**70**);酸性条件下,N-9 与 C-11 间的作用类似于氢键,C-11 显示醛羰基碳的性质(**71**),这种现象是由于 N-9 与 C-11 在空间上极为接近造成的,即所谓的“空间接近效应”(proximity effect),这是首次在天然产物中观察到这种效应[69]。

64　**65**

66　**67**　**68**

69　　70　　71

海绵中的环肽、聚醚和大环内酯化合物都结构极为复杂的次生代谢产物,显示多种生理活性[57]。由海绵 *Halichondria okadai* 得到的 okadaic acid (**72**)对蛋白磷酸酯酶具有高度的选择性抑制作用,已作为"药理学探针"用于炎症等疾病的机理研究中[70]。从东印度洋马尔代夫海绵 *Spongia* sp. 发现的 spongistatin 1(**73**)是一种高效抗有丝分裂剂,具有强烈的抗肿瘤活性,它对大鼠白血病细胞 L1210 的抑制作用是海兔毒素 10(dolastatin 10, **6**)的 12 倍[71]。其不对称全合成工作业已完成[72]。环肽 cycloithistide A (**74**)具有很强的抗真菌活性[73],dihydrocyclotheonamide A (**75**)和 papaumides A (**76**)则分别显示抗凝血和抗病毒作用[74]。

72

73

74

75

76

海绵中的聚烯炔类化合物均为线形长链结构,一般含有 46 个碳原子或 30 个碳原子,其他链长的多聚烯炔化合物也有发现。它们具有抗微生物、抗肿瘤、抗病毒以及酶抑制作用等活性。聚烯炔类化合物是地中海海绵 *Petrosia ficiformis* 的特征次生代谢产物,从该种海绵中先后得到 20 多个 C-46 聚烯炔类化合物,这些化合物均具有特征的 1-炔 3-羟基 4-烯的末端结构。我们用改进 Mosher 法率先对其立体化学进行了测定[75]。海绵中的甾体化合物比其他动物更加富于变化,分子中不但有高度的氧化、开环、芳化等现象,而且出现了对称和不对称的二聚情况,经常有新骨架产生。我们从南海倔海绵 *Dysidea* sp. 中得到的甾体化合物 dysideasterol A(**77**)及其同系物都是含有新颖 9α,11α-环氧和 19-羟化的多羟基甾醇,化合物结构得到 X 射线晶体衍射的确定,其绝对立体构型通过改进的 Mosher 方法得以确证[76]。甾体化合物具有抗病毒、抗肿瘤、抗过敏等多种生物活性。1992 年,从 Okinawan 海绵 *Xestospongia bergquistia* 中分离得到的 xestobergsterol A (**78**)和 B (**79**) 是一种新颖的五环 C-27 甾体类化合物,对 anti-IgE 诱导的小鼠腹膜 mast cell 的组胺释放具有显著的抑制作用,其活性是目前临床常用抗过敏药 disodium cromoglycate(IC_{50}, 262μmol/L)的 5200 倍[77]。Xestobergsterol A、B 显著的抗组胺释放作用提示该类化合物非常有希望开发为新型的抗过敏药,Xestobergsterol A 的全合成工作已于 1999 年完成[78]。

77

78　$R_1 = R_2 = H$

79　$R_1 = R_2 = OH$

三、软体动物门

海洋软体动物的研究多集中于复足纲后鳃亚纲。由于失去了物理外壳的保护,后鳃亚纲软体动物的生存主要依赖于其一系列的化学防卫系统,参与这一系统的化学物质本身都是具有趋避、拒食或强烈毒性的化合物,这一现象为我们提供了一条可能的、有别于传统方法的从自然界寻找具有生物活性化合物的天然筛选模型[79]。早期发现于软体动物海兔 *Dolabella auricularia* 的海兔毒素 10 (dolastatin 10, **6**)是一个具有良好抗肿瘤活性的多肽,它对谷氨酸诱导的细胞微管蛋白的聚合有抑制作用,目前已进入临床研究[6]。

除多肽外,海洋软体动物中还包括萜类、甾体、类胡萝卜素、生物碱、大环内酯

以及聚丙烯衍生物等众多化合物类型。在对海洋软体动物的化学生态学考察的过程中,我们曾对来自红海的裸鳃类软体动物血红六鳃(*Hexabranchus sanguineus*)以及来自中国南海的舌尾海牛 *Glossodoris ruformarginata*、叶海牛 *Phyllidiella pustulosa* 的化学成分进行了研究,从中得到了异腈倍半萜、异腈二萜、scalarane 二倍半萜以及含有α,β-不饱和δ-丁内酯结构的胡萝卜素,这些化合物多是软体动物所摄食海绵中的典型化合物骨架,表明它们之间捕食与被捕食的食物链关系。同时,这些化合物多具有细胞毒性或鱼毒性,说明这些化合物在动物体中起着化学防御功能[80]。

海洋软体动物中的次生代谢产物多数是从其食物中通过生物积累、生物修饰产生的,部分是动物体通过自身的酶系生物合成得来。因此,软体动物中的次生代谢产物与其食源生物有着密切关系。海藻中的典型化合物经常发现于囊舌目(Sacoglossa)、无盾目(Anaspidea)等草食性动物,而从背盾目(Notaspidea)、裸鳃目(Nudibranchia)等肉食性动物体内,则经常得到珊瑚、海绵、海鞘和苔藓虫等动物的代表性代谢产物[9,59,79,81]。存在于 *Bryopsis* 属绿藻的抗肿瘤环肽 kahalalide F (**44**)[28] 及其类似物,同样存在于摄食它们的软体动物 *Elysia rubefescens* 中[82]。软体动物与其食物中次生代谢产物的同源性,为海洋生物的生态学研究提供了化学依据。

第四节 海洋微生物和浮游生物

海洋微生物和浮游生物包括海洋细菌、防线菌、蓝细菌、真菌、古生菌、原绿藻和真核微藻等。目前得到研究的海洋微生物多数与陆地微生物有着极高的同源性,实际上多属于陆地微生物的变种;只有海洋微藻、海洋防线菌等少数物种是真正的海洋品种。

海洋微生物的次生代谢产物结构复杂、骨架多变,很难一言以蔽之。总体说来,环肽、生物碱、含卤化合物、大环内酯、聚醚和长链多烯多羟基化合物是较为常见的。这些化合物具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、调节血压和免疫调节等诸多作用,而且经常表现为强烈的海洋毒素。

1981 年,由甲藻 *Gymnodinium breve* 得到的短裸甲藻毒素(brevetoxin B, **2**)是人类从甲藻得到的第一个海洋天然毒素;短裸甲藻毒素是钠离子通道活化剂,其分子骨架的基本单元是六元至八元环聚醚,这个巨大的分子结构是最后通过 X 射线衍射实验才确定下来[2]。最近从采自中国海南三亚的前沟属甲藻(*Amphidinium* sp.)中,我们发现了 3 个抗癌活性极强的长链多烯多羟基化合物 lingshuiol (**80**)、lingshuiol A 和 B,它们对人肺癌细胞 A549 及非常白血病细胞 L1210 的 IC_{50} 值分别为 0.21μg/mL、0.87μg/mL、0.045μg/mL 和 0.23μg/mL、0.82μg/mL、

0. 49μg/mL，这是国内对该类生物的首次化学/生物活性研究[83]。当然，微藻中也有类似 curacin A (**81**) 这样的结构较为简单的活性物质。Curacin A 具有与紫杉醇相同的抗癌机理，其药用前景十分看好[84]。

近年海洋微生物研究的最激动人心的成果是"*Salinospora*"属海洋防线菌的发现。*Salinospora* 是真正的海洋菌种，它具有独特的 16S rDNA 序列，只能在有盐的条件下生长。其代谢产物 salinosporamide A (**82**) 对人结肠癌细胞株 HCT-116 显示极强的细胞毒，其 IC_{50} 值仅为 11ng/mL；对 NCI 的其他 60 种瘤株也显示广泛的强抑制活性，有着诱人的应用前景[85]。*Salinospora* 菌株的发现与人工培养的成功，为人类发掘新的药用资源提供了某种可能，具有非常深远的意义。

80

81　　**82**

第五节　其　　他

尾索动物门的海鞘是近年来研究比较活跃的海洋生物，其次生代谢产物包括脂类、萜类、大环内酯以及含氮化合物等多种类型。多种多样的含氮化合物是海鞘次生代谢产物的特点，主要包括环肽、生物碱和二聚甾体生物碱等，它们主要显示肿瘤细胞毒性。目前，发现于海鞘的化合物中，环肽 didemnin B (**83**)[86]、四氢异喹啉生物碱 ecteinascidin 743 (**5**)[5] 作为抗肿瘤药物均已进入临床前研究，它们都是含氮化合物。

83

草苔虫内酯 bryostatin 1 (**4**)是 20 世纪 60 年代末发现于苔藓动物门动物 *Bugula neritina* 中的二十六元大环内酯类成分。它的结构研究历经 10 余年的时间,直到 1982 年才通过 X 射线衍射最终得以确定[4]。Bryostatin 1 具有极强的抗肿瘤活性,目前已作为治疗白血病、淋巴癌、肾癌、宫颈癌和黑色素瘤等多种肿瘤的药物完成Ⅱ期临床实验,预计不久即可面市。

此外,像河豚毒素(**84**)[87]及石房蛤毒素(saxitoxin, **85**)[88]等海洋毒素的发现,在海洋天然产物的研究史上都有重要的意义。这些化学物质的发现极大地加深了人类对于海洋天然成分乃至自然界的认识,带动了药理学、分子生物学、分类学以及生态学等多种学科的发展。

84　　85

近年来,随着分子生物学等学科的发展,对于海洋生物产生次生代谢产物的体内生物转化、生物合成过程的研究也十分活跃,美国的 William Gerwick 教授、意大利的 Guido Cimino 教授、加拿大的 Raymond J. Andersen 教授以及澳大利亚的 Mary Garson 副教授所领导的研究小组,已经率先进入到该领域,走在了世界前列。

第六节　研究实例：中国南海网状软柳珊瑚的化学成分研究

网状软柳珊瑚（*Subergorgia reticulata*）属于柳珊瑚目（Gorgonacea）软柳珊瑚科（Subergorgiidae）软柳珊瑚属（*Subergorgia*）动物。在我国主要分布于海南、广东沿海和香港海域[89]。软柳珊瑚属珊瑚中含有多种结构新颖的化合物。在这些化合物中，最引人注目的是其中的倍半萜化合物，共包含有种 3 种骨架：subergane[90~92]、quadrone[93]和β–caryophyllene[93,94]；另外，还发现了 9,11–开环的甾体[95,96]。

在对我国海洋资源进行全面考察的过程中，我们从中国海南三亚海域采集到网状软柳珊瑚样品，并对其化学成分进行了系统研究。从中发现的 5 个高度氧化的新甾体化合物，suberoretisteroids A~ E (**47**，**86**~**89**)，它们结构中都含有罕见的 24–缩酮结构[34]。

86　R_1＝H, R_2＝Ac
87　R_1＝R_2＝Ac

88

89

分离流程如图 17－7 所示。

Suberoretisteroids A~ E (**47**，**86**~**89**)的结构主要是通过波谱数据的解析，结合化学沟通及与之前从印度洋柳珊瑚中分离得到的相关甾体[97,98]的波谱数据比较得以确定。尤其化合物 **47** 的结构及相对立体构型得到单晶 X 衍射试验的进一步确证[99]。

在体外抗肿瘤活性测试试验中，suberoretisteroid A（**47**）对人肺癌 A–549 和

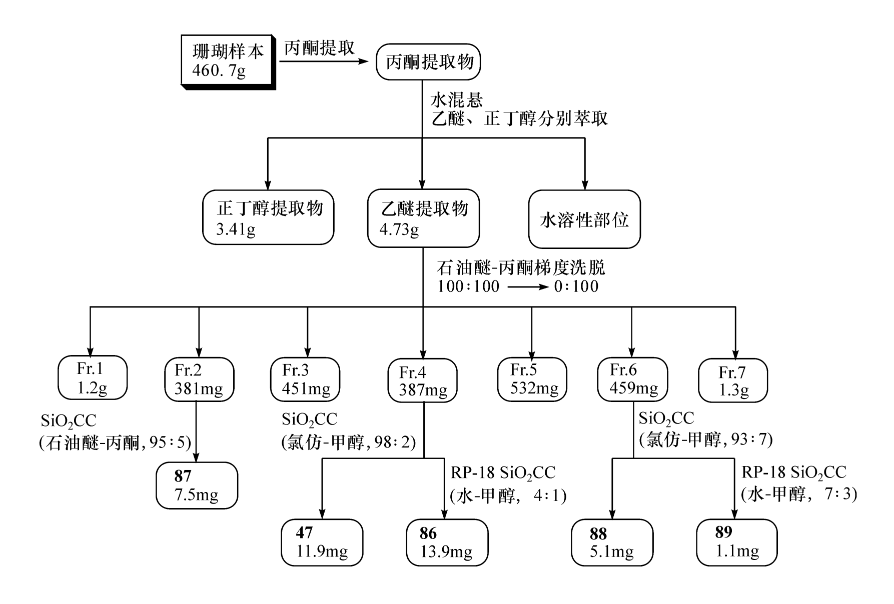


图 17－7　网状软柳珊瑚的分离流程图

人宫颈癌 HELA 两种瘤株显示一定细胞毒活性，它在 10^{-6} mol/L 时对两种瘤株的抑制率分别为 43.3 %和 31.1 %。

参　考　文　献

[1] Tsuda M et al. Tetrahedron Lett, 1998, 39:1207

[2] Lin Y Y et al. J Am Chem Soc, 1981, 103:6773

[3] (a) Moore R E et al. Science, 1971, 172:495

(b) Moore R E et al. J Am Chem Soc, 1981, 103: 2491

[4] Pettit G R et al. J Am Chem Soc, 1982, 104:6846

[5] Wright A E et al. J Org Chem, 1990, 55:4508

[6] Pettit G R et al. J Am Chem Soc, 1987, 109:6883

[7] Hirata Y et al. Pure Appl Chem, 1986, 58:701

[8] Look S A et al. J Org Chem, 1986, 51:5140

[9] Blunt J W et al. Nat Prod Rep, 2005, 22:15~61 和早期同系列综述

[10] 陈树培. 植物生态学与地植物学丛刊, 1985, 9: 59

[11] 赵亚等. 中国天然药物, 2004, 2: 135

[12] (a) Wang J D et al. Helv Chim Acta, 2004, 87: 2829

(b) Wang J D et al. Helv Chim Acta, 2005, 88: 979

[13] Wu J et al. Org Lett, 2004, 6: 1841

[14] (a) Sun Y Q et al. Tetrahedron Lett, 2004, 45: 5533
(b) Sun Y Q et al. Z Kristallogr NCS, 2004, 219: 121
[15] (a) Kato A. Tetrahedron Lett, 1972, (3): 203
(b) Kato A. Phytochemistry, 1975, 14: 1458
(c) Kato A. Phytochemistry, 1976, 15: 220
[16] 毛水春等. 中草药, 2004, 35: 8
[17] Juagdan E G et al. Tetrahedron, 1997, 53(2): 521
[18] Mao S C et al. Helv Chim Acta, 2005, 88: 1034
[19] Vairappan C S et al. Phytochemistry, 2001, 58: 517
[20] Fisch K M et al. J Nat Prod, 2003, 66: 968
[21] Bennamara A et al. Phytochemistry, 1999, 52: 37
[22] Ochi M et al. Bull Chem Sco Jpn, 1986, 59: 661
[23] Ayyad S E N et al. Z Naturforsch, C: Biosci, 2003, 58: 33
[24] (a) Gerwick W H et al. Tetrahedron Lett, 1979, 145
(b) Gerwick W H et al. J Org Chem, 1981, 46: 22
[25] Wessels M et al. J Nat Prod, 1999, 62: 927
[26] (a) Paul V J et al. Phytochemistry, 1982, 21: 468
(b) Paul V J et al. Tetrahedron Lett, 1982, 23: 3459
(c) Well R L et al. Experientia, 1979, 35: 1544
[27] (a) Maiti B C et al. J Chem Res, 1978, 126
(b) Schewede J G et al. Phytochemistry, 1987, 26: 155
[28] Hamann M T et al. J Am Chem Soc, 1993, 115: 5825
[29] Bonnard I et al. J Nat Prod, 2003, 66: 1466
[30] (a) 张文等. 中国天然药物, 2003, 1: 69
(b) Coll J C. Chem Rev, 1992, 92: 613
[31] Schmitz F J et al. Tetrahedron Lett, 1966, 7: 97
[32] Guo Y W. J Nat Prod, 1999, 62: 1194
[33] Kazlauskas R et al. Tetrahedron Lett, 1977, 4439
[34] Zhang W et al. Helv Chim Acta, 2005, 88: 87
[35] Zhang W et al. J Nat Prod, 2004, 67: 2083
[36] 巫忠德等. 中山大学学报(自然科学版), 1982, (3): 69
[37] Zhang W et al. Helv Chim Acta, 2004, 87: 2919
[38] Burks J E et al. Acta Cryst, 1977, B33 (3): 704
[39] Sung P J et al. J Nat Prod, 1999, 62: 457
[40] Zhang W et al. Helv Chim Acta, 2004, 87: 2341
[41] (a) González N et al. J Org Chem, 2002, 67: 5117
(b) Banjoo D et al. J Nat Prod, 2002, 65: 314
(c) Taglialatela-Scafati O et al. Org Lett, 2002, 4: 4085

[42] Rodríguez A D et al. Org Lett, 1999, 1: 337
[43] 严小红等. 中国天然药物, 2005, 3: 65
[44] Carmely S et al. Tetrhedron Lett, 1980, 21: 875
[45] Watanabe K et al. J Nat Prod, 2001, 64: 1421
[46] Iwashima M et al. J Org Chem, 2002, 67: 2977
[47] (a) Shao Z Y et al. J Nat Prod, 2002, 65: 1675
(b) Yan X H et al. Chin Chem Lett, 2005, 3: 356
[48] Bortolotto M et al. Steroids, 1976, 28: 461
[49] Jia R et al. Nat Prod Res, 2005, 19: 789
[50] Morris L A et al. Tetrahedron, 1998, 54: 12953
[51] 严小红等. 有机化学, 2004, 24: 1233
[52] Jia R et al. Helv Chim Acta, 2005, 88: 1028
[53] El Sayed K A et al. J Nat Prod, 1996, 59: 687
[54] Zeng L M et al. J Nat Prod, 2004, 67: 1915
[55] (a) Armstrong R W et al. J Am Chem Soc, 1989, 111: 7525
(b) Suh E M et al. J Am Chem Soc, 1994, 116: 11 205
[56] (a) 龙康候等. 有机化学, 1985, 5: 360
(b) Fusetani N et al. Chem Rev, 1993, 93: 1793
[57] 黄孝春等. 中国天然药物, 2005, 3: 1
[58] (a) Guo Y W et al. Nat Prod Lett, 1997, 10: 143
(b) Guo Y W et al. J Asia Nat Prod Res, 2000, 2: 251
[59] Garson M J et al. Nat Prod Rep, 2004, 21: 164
[60] (a) Hirota H et al. Tetrahedron, 1998, 54: 13971
(b) Wratten S et al. Tetrahedron Lett, 1978, 1391
(c) Wratten S et al. Tetrahedron Lett, 1978, 1395
(d) Simpson J S et al. Tetrahedron, 1997, 38: 7947
(e) Tanaka J et al. J Nat Prod, 1999, 62: 1339
[61] (a) Zhang W H et al. J Nat Prod, 2001, 64: 1489
(b) Blackburn C L et al. J Org Chem, 1999, 64: 5565
(c) Crews P et al. Tetrahedron, 2000, 56: 9039
[62] Potts B C M et al. J Am Chem Soc, 1992, 114: 5039
[63] Guo Y W et al. Nat Prod Lett, 1996, 9: 105
[64] (a) Yu Z G et al. Helv Chim Acta, 2005, 88: 1004
(b) Yu Z G et al. Z Kristallogr NCS, 2004, 219: 415
[65] Gunasekera S P et al. J Am Chem Soc, 1996, 118: 8759
[66] Jiménez J I et al. J Org Chem, 2000, 65: 6837
[67] Capon R J et al. J Nat Prod, 1998, 61: 660
[68] (a) Guo Y W et al. Tetrahedron, 1996, 52: 8341

(b) Guo Y W et al. Tetrahedron, 1996, 52: 14 961
(c) Guo Y W et al. Tetrahedron Lett, 1998, 39: 463
[69] Guo Y W et al. Tetrahedron, 1998, 54: 541
[70] Bialojian C et al. Biochem J, 1988, 256: 283
[71] Bai R et al. Mol Pharmacol, 1993, 44: 757
[72] (a) Paterson I et al. Angew Chem Int Ed Engl, 2001, 40: 4055
(b) Crimmins M T et al. J Am Chem Soc, 2002, 124: 5661
[73] Clark DP et al. J Org Chem, 1998, 63: 875
[74] (a) Nakao Y et al. J Am Chem Soc, 1999, 121: 2425
(b) Ford P W et al. J Am Chem Soc, 1999, 121: 5899
[75] (a) Guo Y W et al. Tetrahedron, 1994, 50: 13 261
(b) Guo Y W et al. J Nat Prod, 1995, 58: 712
(c) Guo Y W et al. J Nat Prod, 1998, 61: 333
[76] Huang X C et al. Helv Chim Acta, 2005, 88: 281
[77] Shoji N et al. J Org Chem, 1992, 57: 2996
[78] (a) Jung W E et al. Org Lett, 1999, 1 (10): 1671
(b) Takei M et al. Experientia, 1993, 49: 145
[79] (a) Karuso P. In:P J Scheuer(ed). Bioorganic Marine Chemistry. Berlin:Springer-Verlag, 1987, 31~ 60
(b) Cimino G et al. Curr Org Chem, 1999, 3: 327
[80] (a) Guo Y W et al. Tetrahedron Lett, 1998, 39: 2635
(b) Gavagnin M et al. J Nat Prod, 2004, 67: 2104
(c) Manzo E et al. J Nat Prod, 2004, 67: 1701
[81] Cimino G et al. In: Tringali C(ed). Bioavtive Compounds from Natural Sources: Isolation, Structure Characterisation and Biological Properties. London: Taylor & Francis Ltd, 2001, 578~ 637
[82] Hamman MT et al. J Org Chem, 1996, 61: 6594
[83] (a) Huang X-C et al. Bioorg & Med Chem Lett, 2004, 14: 3117
(b) Huang X-C et al. Tetrahedron Lett, 2004, 45: 5501
[84] (a) Gerwick W H et al. J Org Chem, 1994, 59: 1243
(b) Blokhin A V et al. Mol Pharmcol, 1995, 48: 523
[85] Feling R H et al. Angew Chem (Int Ed), 2003, 42: 355
[86] Sakai R et al. J Med Chem, 1996, 39: 2819
[87] McConnell O J et al. In: Gullo V P(Ed). The discovery of Natural Products with Therapeutic Potential. Boston (MA): Butterworth-Heinemann, 1994, 109
[88] Kao C Y. Fed Proc, 1973, 31: 1117
[89] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布. 北京:海洋出版社,1994. 295~ 297
[90] Groweiss A et al. Tetrahedron Lett, 1985, 26: 2379

[91] Parameswaran P S et al. J Nat Prod, 1998, 61: 832
[92] Wang G H et al. J Nat Prod, 2002, 65: 1033
[93] Bokesch H R et al. Tetrahedron Lett, 1996, 37: 3259
[94] Wang G H et al. J Nat Prod, 2002, 65: 887
[95] Anjaneyulu A S R et al. Indian J Chem, 1997, 36B: 418
[96] Aknin M et al. Steroids, 1998, 63: 575
[97] Subrahmanyam C et al. Chem Res (S), 2000, 182
[98] Anjaneyulu ASR et al. Nat Prod Res, 2003, 17: 149
[99] Zhang W et al. Acta Cryst, 2005, E61: 2884

第十八章　天然产物的化学合成

复杂天然产物的全合成一直占据着有机化学研究的中心位置，这不仅仅是因为自然界不断地使人们看到一些令人吃惊的、在合成上非常有挑战性的分子，以吸引有机合成化学家去合成，更重要的是，通过对复杂化合物进行的化学合成会带来有机化学领域和有关天然产物的利用的重大发展。

日本名古屋大学后藤俊夫（T. Goto）则认为天然产物合成具有以下目的：①确定结构；②提供样品（天然来源有限时）；③合成衍生物；④发展新反应和新的理论。

在波谱技术和 X 射线单晶衍射广泛应用以前，合成曾经是确定天然产物分子结构的权威手段。虽然现在全合成确定结构的作用已经下降了很多，但是有机化学家还是常常会面对一些极微量的非晶体天然产物，由波谱技术只能确定大致的结构，而其细节只能由全合成来确定。

例如，酯氧三醇 A（lipoxin A）的 5，6-位构型，是全合成 4 个异构体后，经比较确定的[1]。

OH S 6 5 S COOH OH 15 S OH

又如，海洋生物中的抗白血病二十碳酸 PUG 通过全合成证明 12-OH 的构型是α 而非β[2]。

AcO O Cl 12 OAc HO

PUG 4

AcO O Cl OAc HO

12-epi-PUG 3

有时天然产物的样品太少时,无法对其性质进行进一步的研究,或由于某种产物有巨大的市场需求,靠天然提取无法满足需要时,就要用合成的手段来提供产品,这种情况发展到极致,就是用合成的方法生产某种天然产物。在天然产物中,很少有以化学方法进行全合成生产的,其中一个比较特殊的例子是薄荷醇。Takasago 公司采用不对称合成方法以年产 1500t 的规模进行生产[3]。

但是在大多数情况下,科学家对天然产物的合成不是以以上两点为目的的。对一些生物活性很好的天然产物,人们往往在合成目标分子的同时,还要合成它们的衍生物,从而对其生物活性的构效关系有一个深入的了解,发展出更有价值的化合物来。很多药物都是从天然产物衍生而来的。

在绝大多数情况下,对天然产物的合成表现为一种对合成化学本身的探索。因为天然产物的复杂性对合成化学家来说本身就意味着一种挑战,对复杂天然产物进行合成是合成艺术的体现。从某种意义上说,合成化学的发展历史就是天然产物合成的历史。正是对天然产物的合成的不懈追求,使得化学家在合成中遇到了各种看似难以克服的困难,为了解决这些困难,发展产出了各种新颖的方法,不断地将合成化学推向前进。

由于天然产物合成的内容浩如烟海,我们不可能在一章中将其做全面的介绍,只能是管中窥豹见其一斑而已。下面按照天然产物的分类做蜻蜓点水的介绍。

第一节　生　物　碱

生物碱一般是指植物中的含氮有机化合物(蛋白质、肽类、氨基酸及维生素除外),是天然产物中最多的一类。其结构千差万别,而且生物碱往往具有很好的生物活性,因而吸引了大量的合成化学家对其进行研究。下面介绍几个生物碱合成中的重要例子。

一、吗啡

吗啡(morphine)是发现较早的生物碱,自从 Gate 第一个合成吗啡以来,对吗啡的合成研究就没有中断过。进入 20 世纪 90 年代以来,有不少全合成和中继合成发表[4]。其中以 Overman 的合成最有代表性。

Overman 从 2-烯丙基环己酮出发,经不对称还原,再巧妙地做成烯丙基硅烷,合成了吗啡的两个对映体。将烯丙基硅烷与已有 A 环的醛用碘化锌处理,烯丙基以很高的非对映选择性(大于 20∶1)俘获了中间体亚胺离子。Heck 反应用于构建连着芳香基的季碳键。再选择性地脱去苄基保护后,将环己烯环氧化,最后形成二氢呋喃环,见图 18-1。

图 18－1

a. ZnI_2; b. $Pd(O_2CCF_3)_2$, PMD; c. $BF_3 \cdot OEt_2$, EtSH; d. 3,5-二硝基苯甲酸, CSA; e. TPAP, NMO; f. H_2, $Pd(OH)_2$, HCHO

二、马钱子碱

马钱子碱(strychnine)是第一个被人们以纯品形式制备得到的生物碱,是在有机化学和天然产物史上具有特殊意义的分子,马钱子碱的化学合成工作曾在 20 世纪 50 年代由于 Woodward 等[5]的合成成功而达到高潮。这样一个含有 7 个环、6 个手性中心的化合物能在当时缺乏有力的结构分析手段的情况下被合成,堪称经典之作。

在中断了 40 年之后,到 20 世纪 90 年代,科学家重新对马钱子碱的合成产生了兴趣。20 世纪 90 年代已有 6 个全合成的报道[6]。其中最突出的例子是 Rawal 的非常简洁的外消旋体合成和 Overman 的对映选择性合成。在 Ramal 的路线中成功地运用了分子内 Diels-Alder 反应和分子内 Heck 反应,使路线显得十分干脆利落(图 18－2)。

前体 **12** 封管加热进行分子内的 Diels-Alder 反应,以 99% 的产率获得化合物 **13**,然后分子内两步形成酰胺以构成 C 环,化合物 **14** 在温和条件下和化合物 **15** 发生 *N*-烷基化得到化合物 **16**。接下来分子内 Heck 反应非对应选择性地形成 F 环,D 环上的双键转移到 C 环上,脱去羟基保护,环化得外消旋的马钱子碱,总收率为 10%,这是目前最好的结果。

图 18－2

a. $Br(CH_2)_2Br$, 50% NaOH; b. DIBAL-H; c. $BnNH_2$, Et_2O; d. TMSCl, NaI, DMF; e. $ClCO_2Me$, 丙酮; f. 10% Pd/C, HCO_2NH_4; g. 23℃; h. $ClCO_2Me$, $PhNEt_2$; i. C_6H_6, 18.5℃; j. TMSI, $CHCl_3$; k. MeOH, 65℃; l. DMF, 丙酮, K_2CO_3; m. $Pd(OAc)_2$, BuNCl, DMF, K_2CO_3, 70℃; n. 2N HCl, THF; o. KOH, EtOH, 85℃

三、喜树碱

喜树碱(camptothecin)有很好的抗肿瘤活性,关于其合成的报道有近 20 来

个,其中最有代表性的是 20 世纪 70 年代蔡俊超等的外消旋喜树碱路线[7]和 90 年代 Comins 的对映选择性合成路线[8]。

蔡俊超等的合成路线见图 18－3。

图 18－3

a. K_2CO_3, DMF, 丙烯酸甲酯; b. HCl, HAc; c. $(CH_2OH)_2$; d. $(EtO)_2CO$, NaH, $PhCH_3$; e. C_2H_5I, NaH, DMF; f. HCl-HAc; g. Ac_2O-HAc, [H]; h. $NaNO_2$; i. $CuCl_2$, DMF, [O]

在图 18－3 的合成路线中,B、C、D 环的形成都很简洁,合成的中心工作是围绕 E 环而展开的,其中形成化合物 **22** 是该路线的关键所在,这一步使得 20-位碳原子活化,使后面的反应能顺利地进行,从而形成 20-位的季碳。这条路线的另一个特点是所用的试剂都很简单,合成中的分离方法主要是重结晶,几乎不用柱层析,其总产率高达 18%。

在 20 世纪 90 年代初,Tagawa 等[9]将蔡俊超等的合成路线进行改进,使其成为一条对映选择性合成的路线(图 18－4)。在喜树碱的衍生物合成研究中,其骨架构建一般都以此路线进行。

Comins 用分子内 Heck 反应构建 C 环,提供了一条很简洁的路线(图 18－5)。

图 18-4

图 18-5

a. ① t-BuLi, THF, -78℃, 1h; ② $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)CHO$; ③ n-BuLi, -23℃, 2h; ④ I_2 (78%)。b. CH_3OH, EtSiH, TFA (98%)。c. n-BuLi, THF, -78℃ α-keto-8-phenylmenthyl butyrate。d. p-PhPhCOCl (60%, 从 33 计算)。e. 2mol/L NaOH, EtOH (76%)。f. TMSCl, NaI, CH_3CN, Dabco, 回流。g. 6mol/L HCl, 100℃ (77%, 两步反应)。h. H_2, Pd/C。i. tBuOK, DME, 回流 (87%)。
j. $Pd(OAc)_2$, Bu_4NBr, KOAc, DMF, 90℃, 3h (59%)

Comins 的合成从一个两步、一锅炒的反应开始：2–氯–6–甲氧基吡啶用特丁基锂处理，芳香锂中间体用甲酰胺俘获，再直接加入 1eq 丁基锂产生负离子，用碘淬灭，得到醛 **32**。用 Et_3SH/TFA 在甲醇中还原化合物 **32** 得到甲醚 **33**。经锂卤交换后加入α–丁酮酸(8–苯基薄荷基)酯，产生的醇负离子中间体用对苯基苯甲酰氯反应，得酯 **34**，经重结晶得光学纯的化合物 **34**。而后经三步反应得化合物 **35**，化合物 **35** 与化合物 **36** 偶联后，便可以用于分子内 Heck 反应，最后得光学纯的喜树碱。

四、利血平

利血平(reserpine)的合成是 Woodward 的代表作之一，他的合成路线[10]如图 18－6 所示。

51　　　　52

53　　　　54

图 18-6

a. PhH, 回流。b. Al(O i-Pr)$_3$, i-PrOH。c. ① Br_2; ② NaOH, MeOH。d. NBS(aq) · H_2SO_4, 30℃。e. ① CrO_3/HOAc; ② Zn/HOAc。f. ① CH_2N_2; ② Ac_2O; ③ OsO_4, $NaClO_3$, H_2O。g. ① HIO_4; ② CH_2N_2。h. PhH。i. $NaBH_4$/MeOH。j. ① $POCl_3$; ② $NaBH_4$(aq)。k. ① KOH/MeOH; ② HCl; ③ DCC/Py。l. t-$BuCO_2H$, 二甲苯。m. ① NaOMe, MeOH, 回流; ② 3,4,5-$(MeO)_3C_6H_2COCl$, 吡啶

E 环是利血平合成的难点,含有五个手性中心。Woodward 用 Diels-Alder 反应,以底物控制的方法将其分别建立起来。由于立体位阻的影响,**42** 上的双键可以选择性地溴化,同时发生分子内的醚化反应。再用甲醇钠处理,甲氧基取代了溴原子而得 **43**,这样,E 环上的手性中心就都建立起来了。其方法之简单和巧妙令人赞叹。再利用 NBS 和水对双键的加成得到 **44**,将 **44** 用铬酐氧化,接着用锌和乙酸处理,不仅使 C-8 位的碳-氧键被还原而在 C-1 位形成仅有的羰基,而且使 C-6 位的碳-溴键和 C-5 位的 3,5 醚桥发生消除,形成双键,得到 **45**。将 **45** 经必要的保护和两步氧化给出 **47**。**47** 是利血平合成的关键中间体。

将 **47** 与 **48** 偶联,还原,再用 $POCl_3$ 处理环化,然后还原给出化合物 **51**。**51** 和利血平已经很接近了,但是,C-3 的手性有问题。通过转化成内酯,用新戊酸在二甲苯中回流,顺利地实现了构型的反转,后经开环,酯化得外消旋的利血平。经拆分可得光学纯的产品。

五、美登素

美登素(maytansine)是一类大环内酰胺生物碱,有良好的抗癌活性,自 1982 年 Corey 等[11] 首先完成其全合成以来,已有好几个小组发表了他们的合成工作,这里介绍我国顾学钦、潘百川、高怡生等的合成工作[12]。

以(－)-(2R,3R)-2-甲基-3-羟基丁二酸为原料,经酯化,LAH 还原,用丙酮保护得醇 **55**,**55** 经以上两步反应制成环氧化合物 **57**,将其与硫缩醛反应,增长一个碳得 **58**。由于硫缩醛是羰基的偶极反转形式,这为以后的片断连接做好了准备。

将 **59** 与 **60** 在 LDA 作用下进行 Wittig 反应,得 **61**。由于目标化合物含有多个双键,其开链前体的合成时使用 Wittig 反应进行片断连接是很好的方法。**61** 经还原,保护,氧化后制成醛,将硫缩醛 **58** 与其反应得 **64** 与 **65**。生成的差向异构体经分离后,S-构型的产物经氧化,Noyori 还原后转化成 R-构型。将 **65** 甲基化,脱保护,氧化成醛,再次使用 Wittig-Horner 反应进行连接,给出化合物 **69**。

将 **69** 用 $NaBH_4$ 还原得一对异构体,分离出所需的 **71**,将另一异构体 **70** 再氧化成原料,可重新用于还原。再经 TBS 保护羟基,水解酯基,即可以 Mukaiyama 酰胺法[13] 成环生成 **73**。接下来的关键问题是选择性地脱保护和引入侧链。**73** 用 2-氯-1,3,2-二硫硼杂烷处理脱去 C-7 位的 MEM 保护成 **74**,继用氯甲酸对硝基苯甲酯处理,得 **75**, 再参照 Corey 的方法合成美登醇,引入侧链后成美登素,如图 18－7 所示。

55　**56**　**57**　**58**

59　**60**　**61**

e　f

62　63

i

64　65

g　h

66

j

67　68　69

k

70　71

72 73 74 75 76 77 78 79

图 18-7

a. ① TBDPSCl, 三乙胺, DMAP, CH_2Cl_2;② 75% HAc;③ TsCl, 吡啶。b. NaH, THF。c. ① LDA, dithiane, THF;② MEMCl, 二异丙基乙基胺。d. LDA, THF。e. ① LAH, $AlCl_3$;② TFAA, Py;③ Ag_2CO_3, PhH。f. BuLi, THF。g. MnO_2。h. (*R*)-BANIL-LAH-EtOH。i. ① CH_2N_2; ② TBAF, THF; ③ [O]。j. LDA THF。k. $NaBH_4$。l. ① TBSCl, imidazol; ② LiOH, DME。m. Mukaiyama's 条件。n. 2-chloro-1,3,2-dithiaborolane, CH_2Cl_2, −78℃。o. *p*-$NO_2C_6H_4OCOCl$, Pyr。p. NH_3/CH_3OH。q. $HgCl_2/CaCO_3$, 二异丙基乙基胺。r. ① HF/H_2O; ② VO(acetylacetone)$_2$, *t*-BuOOH。s. *N*-acetyl-*N*-methyl-L-alanine, DCC, $ZnCl_2$

第二节　萜　　类

一、单萜

单萜化合物一般是指其基本骨架可以看作由两个异戊二烯或异戊烷头尾相接而成的一类化合物,其骨架较小,在合成中要解决的中心问题是手性中心的控制问题。

薄荷醇(menthol)是一个很重要的单萜,其全世界的工业产量达每年 3500t,其中 30%的产量来自日本的 Takasago 公司,因为他们发明了一种光学纯薄荷醇的工业合成方法[14],其工艺如图 18－8 所示。

80 —a→ **81** —b→ **82** (NEt_2) —c→ **83** (NEt_2) —d→ **84** (O) —e→ [**85** ($O^{\oplus}$, ZnLn, H)] → **86** (OH) —f→ **87** (OH)

图 18－8

a. 热裂解; b. *n*-BuLi (cat.), Et_2NH; c. {Rh[(*S*)-BINAP](COD)} ClO_4 (cat.), 100℃; d. aq. H_2SO_4; e. $ZnBr_2$; f. H_2, Ni

以较便宜的β-松油二环烯为原料,热裂解成月桂烯,经丁基锂催化下的调聚反应立体选择性地接上二乙胺基。其中最重要的一步是[Rh((*S*)-BINAP)(COD)ClO_4]催化下的不对称异构化反应,形成手性甲基,其 ee 值大于 98%。这个手性甲基还被用于以后的反应中控制另两个手性中心的形成。将 **83** 水解,得 *R*-香茅醛,其 ee 值高达 98%以上,比从自然界中提取的还要高很多,天然提取的香茅醛 ee 值一般不超过 80%。将 *R*-香茅醛用溴化锌处理,底物经过椅式过渡态形成异蒲勒醇 **86**,经过低温结晶可得到接近 100%光学纯的产品。将异蒲勒醇催化氢化,即得

(－)-薄荷醇。

图 18-9

a. ① $ZnBr_2$；② B_2H_6；H_2O_2，NaOH。b. ① $PhCH_2Cl$-NaH；② 琼斯氧化。c. LDA，$CH_2{=}C(Me_3Si)COCH_3$。d. ① $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$；② $(COOH)_2$。e. ① $NaBH_4$；② 琼斯氧化。f. ① MeMgI；② *p*-TsOH。g. ① Na-NH_3(l)；② CH_2N_2；③ $NaBH_4 \cdot 6H_2O$。h. O_3；MeS_2。i. $HS(CH_2)_3SH$-$BF_3 \cdot Et_2O$。j. ① $HC(OMe)_3$，*p*-TsOH；二甲苯；② $HgCl_2$-$CaCO_3$-CH_3CN(aq)。k. O_2，四碘四氯荧光素，紫外光，$HClO_4$

二、倍半萜

倍半萜的基本骨架可以看作由三个异戊二烯构成。倍半萜广泛存在于植物、微生物、海洋生物及某些昆虫中,其中很多具有重要的生物功能和生理活性。青蒿素(*artemisinin*)是一个很重要的倍半萜,它是我国发现的抗疟新药,具有速效和低毒的特点。在疟原虫对奎宁类抗疟药有耐药性时,青蒿素就显得更为重要。关于青蒿素的合成已经有不少报道,这里介绍许杏祥等[15]的合成工作(图 18－9)。

将 **88** 用已知途径转化为双羟基化合物 **89**,选择性地将伯羟基苄基化,随后用 Jones 试剂氧化给出酮 **90**。将酮用 LDA 动力学去质子,所得烯醇与硅基丁烯酮反应,再除去三甲基硅基后得酮 **91**。用 $Ba(OH)_2$ 环化,而后酸化形成α,β-不饱和酮 **92**。将 **92** 在 $NaBH_4$-Py 中还原,再用 Jones 试剂氧化生成酮 **93**。**93** 与 MeMgI 反应,再用对甲苯磺酸消除羟基,生成 **94** 和它的 Δ^3 异构体,比例约为 1∶1。用快速柱层析分离得 **94**。

将 **94** 还原、Jones 氧化、酯化后生成青蒿酸甲酯 **95**,臭氧化得 **96**,以选择性地硫缩酮保护生成 **97**。**97** 用原甲酸三甲酯处理后生成烯醇甲醚,用 $HgCl_2$-$CaCO_3$ 脱去硫缩酮保护生成关键中间体 **98**。将 **98** 的甲醇溶液在氧气和玫瑰红存在下氧化产生过氧键得 **99**,**99** 用 70%的 $HClO_4$ 处理得青蒿素 **100**。

三、二萜

丹参酮类属于二萜醌类化合物,其药理实验证明有良好的生物活性,由于其骨架比较一致,可以用通用的方法合成。其中用 Diels-Alder 方法构建骨架被认为是最好的方法。Lee[16] 把超声波促进反应的方法应用于丹参酮的合成,得到了良好的结果。他的合成路线以丹参酮ⅡA(tanshinone ⅡA)为例,如图 18－10 所示。

HO 101 —a→ 102 + 103 —b, c→ 104

图 18－10

a. Fremy's 盐; b. 超生波; c. DDQ, 苯, 回流

邻醌 **102** 比较不稳定,用加热条件进行 Diels-Alder 反应会影响收率,而且在加热条件下其立体选择性较差,会得到接近 1 ∶ 1 的异构体,而在超声波条件下,条件温和,产率高,而且选择性好,生成的异构体少于 5%。

雷公藤内酯(triptolide)表现出许多良好的生物活性,自从 Berchtold[17] 完成它的全合成以来,有关它和它的衍生物合成有许多报道发表。杨丹等利用最近发展的三氟乙酸镧催化的自由基成环反应,立体选择性地实现了它的合成[18],如图 18－11 所示。

图 18－11

a. MOMCl, NaH, THF, 65℃, 2.5h, 99%; b. *n*-BuLi, THF, －40～20℃, 2h, 然后－78℃, MeI, 1h, 98%; c. *s*-BuLi, THF, －78℃, **107**, 1h, 98%; d. TMSCl, $LiBF_4$, CH_3CN, －10～25℃, 4h, 97%; e. Me_2SO_4, K_2CO_3, 丙酮, 回流, 2.5h, 100%; f. SeO_2, *t*-BuOOH, CH_2Cl_2, 0℃, 8h, 然后 $NaBH_4$, MeOH, 73%; g. MsCl, Et_3N, CH_2Cl_2, －40～－20℃, 1h, 然后 LiBr, THF, －20～25℃, 2h, 96%; h. $CH_3COCH_2COOCH_3$, NaH, *n*-BuLi, THF, 0℃, 1h, 85% i. DMAP, 甲苯, **113**; j. $Mn(OAc)_3 \cdot 2H_2O$, $Yb(OTf)_3$; k. KHMDS, $PhNTf_2$; l. ①DIBAL-H; ②$Pd(PPh_3)_4$

在合成雷公藤内酯时,杨丹等借鉴了 Tamedem 等的合成方法[19],把合成的重点放在立体选择性合成中间体(＋)-**112** 上。将 **105** 用 MOMCl 保护,通过 *n*-BnLi, MeI 接上甲基,再用 *s*-BuLi 在 THF 中生成负离子,用 **107** 处理生成烯 **108**,但是在下一步氧化时产率不佳,更替保护基后可以以 73% 的产率氧化,而后溴化成 **109**,可用双离子化的乙酰乙酸甲酯取代溴产生前体 **110**。将 **110** 在甲苯中用 DMAP 催化酯交换接上手性辅剂 **113**, 在 $Mn(OAc)_3$ 和 $Yb(OTf)_3$ 的催化下,以 73% 的产率和 38 ∶ 1 的 de 值得到所希望的三元环化合物 **111**。

Crisp 方法[20] 用来将 **111** 构建成α,β 不饱和酮(＋)-**112**,先将 **111** 三氟磺酸

化,DIBAL 还原,而后在 $Pd(PPh_3)_4$ 催化下生成(+)-**112**。

在合成完(+)-**112** 后,将其用 CrO_3 氧化,脱保护,$NaBH_4$ 还原,以 $NaIO_4$ 高产率地氧化生成(-)-**114**,形成第一个环氧;以三氟丙酮和 Oxone 的混合物氧化出第二个环氧;以 $H_2O_2/NaOH$ 氧化出第三个环氧,最后用 $NaBH_4$ 还原得到雷公藤内酯,如图 18－12 所示。

OMe　OH　OH　H　a~c　d　O　(+)-**112**　(+)-**113**

O　H　e　f　CF_3　(−)-**114**　(−)-**115**

OH　g　(−)-**116**　(−)-**117**

图 18－12

a. CrO_3, Hac (aq),室温, 45%; b. BBr_3, CH_2Cl_2, －78℃ 至室温, 99%; c. $NaBH_4$, CH_3OH, 0℃, 2h, 99%; d. $NaIO_4$, $MeOH/H_2O$, 0~ 25℃, 1h, 96%; e. CF_3COCH_3, 过硫酸氢钾制剂, $NaHCO_3$, CH_3CN/H_2O, $Na_2(EDTA)$, 25℃, 4h, 70%, f. H_2O_2, NaOH, MeOH, 25℃, 3h, 96%; g. $Eu(FOD)_3$, CH_3OH, 49%

第三节　黄　酮　体

黄酮体的母核基本上可由下述两种途径合成:①1 个 C_6C_2 单元与 1 个 C_6C_1 单元缩合。例如,2-羟基苯乙酮衍生物 **118** 与苯甲醛衍生物 **119** 缩合或 2-羟基苯乙酮衍生物 **118** 与苯甲酰氯衍生物 **120** 生成酯 **121** 后,再分子内形成黄酮体 C_6-C_3-C_6 母核 **116**;②1 个 C_6C_3 单元与 C_6 单元缩合。例如,肉桂酰氯衍生物 **124** 与

苯酚衍生物**123**酰化,也可生成黄酮体母核**122**。此外,还有很多类似的合成途径。由于A环、B环、C环的取代基对各种具体化合物的合成有一定影响,在这些合成路线的基础上,出现了许多改良方法。以典型化合物为例,黄酮的一般合成路线如图18－13所示。

图18－13

一、查尔酮类和双氢黄酮类的合成

查尔酮可作为合成各类黄酮体的中间体,因此查尔酮的合成是合成黄酮体的重要环节。上述合成黄酮体的两条途径都能合成查尔酮。一般是具有欲合成查尔酮A环结构的苯乙酮衍生物与具有B环结构的苯甲醛衍生物在强碱条件下醛酮缩合,或在强酸条件下缩合而成。其中以50%~60%KOH或NaOH催化,在0~20℃缩合较常用,但是在酸、碱条件下可使查尔酮进一步闭环生成相应的双氢黄酮或者二者的混合物。

甘草查尔酮(licochalcone)的全合成[21]:合成甘草查尔酮**130**的主要工作是制备B环片断。中间体**127**在丁酸酐与二甲基苯胺作用下经克莱森重排和酯化生成中间体**128**,水解后得到B环片断**129**。如果没有丁酸酐酯化,克莱森重排的产率较低。然后将化合物**129**与A环片断对－羟基苯乙酮在酸催化下缩合成甘草查尔酮**130**(图18－14)。因为该查尔酮的2′-位无羟基,在酸催化缩合时不会进一步闭环而生成双氢黄酮。

存在2′-羟基的查尔酮,在1%~2%的酸或碱中室温放置过夜,闭环生成相应的双氢黄酮。若在2′、6′-位同时具有羟基,可加速环合进程。另外,查尔酮有3′-

位取代或有 4-OH 可抑制其闭环反应。

125 126 127

128 129

130

图 18 - 14

a. K_2CO_3，丙酮；b. *N*，*N*-二甲基苯胺，丁酸酐，190～200℃；c. NaOH，EtOH；

d. 对羟基苯乙酮，HCl，EtOH

二、黄酮类和黄酮醇类的合成

由查尔酮或二氢黄酮脱氢可合成相应的黄酮化合物；双氢黄酮醇脱氢可获得相应的黄酮醇化合物。但合成黄酮类、黄酮醇类化合物不一定要经过查尔酮、双氢黄酮或双氢黄酮醇中间体，可直接缩合而成，常用的合成方法有以下几种。

（一）Baker-Venkatereman 法[22]

以黄芩素三甲醚(baicalein)的合成为例：这个方法的关键是分子内克莱森重排，中间体 **133** 在强碱——氢氧化钾或氢氧化钠的吡啶或苯、甲苯溶液中处理，生成β-二酮中间体(**134**)。

再以酸(H_2SO_4/EtOH)或弱碱(NaOAc/AcOH)处理，则闭环生成黄芩素三甲醚(**135**)。β-二酮(**134**)以过氧甲酸处理，在羟基化的同时闭环生成 3-羟基黄芩素三甲醚(**136**)(图 18 - 15)。因此，这个方法可以延伸合成黄酮醇类。

（二）Algar-Flynn-Oyamada 合成[23]

2′-羟基查尔酮(**137**)用碱性过氧化氢氧化一步可得到相应的黄酮醇，其反应

图 18－15

a. K_2CO_3/Py; b. KOH/Py; c. H_2SO_4/EtOH; d. HCOOOH

机理是经过查尔酮的环氧化合物 **138** 生成双氢黄酮醇，该方法的副反应是亲核取代生成化合物 **142**(图 18－16)。取代基和反应温度对选择性有影响：①2-或 4-位具有羟基，6′-位没有甲氧基的查尔酮，反应产物主要是黄酮醇；②反之，6′-位有甲氧基并缺少 2-或 4-位羟基，则生成化合物 **142** 和黄酮醇的混合物；③高温对生成黄酮醇有利。

图 18－16

(三) 异黄酮类的合成

异黄酮的合成有很多种方法，经典的方法是以苯基苄基酮的衍生物 **145** 闭环

而成。闭环试剂的种类较多,如原甲酸三乙酯、氰化锌/盐酸、二甲基甲酰胺/三氯氧磷、甲酸乙酯/钠等。这些闭环剂对结构都有一定要求。例如,原甲酸三乙酯只限于苯基上有 2,3,6-三羟基取代的化合物;二甲基甲酰胺和三氯氧磷只限于间苯二酚氧化方式的化合物等。

甲酸乙酯法[24]合成芒柄花素(formononetin,**147**)即为该方法的一例(图 18－17)。

图 18－17

第四节　蒽醌类的合成

早在 19 世纪中叶,人们就对蒽醌进行合成研究。由于蒽醌类化合物的生理作用,尤其是抗肿瘤蒽环类抗生素的发现,激励人们不断地寻找新的合成方法。有关蒽醌环的合成方法大致有下列几种。

一、应用 Friedel-Crafts 反应

蒽醌的经典合成方法是用邻苯二甲酸获其衍生物,与苯酚的衍生物进行双重 Friedel-Crafts 缩合。但对于不对称氧代蒽醌,该方法缺乏位置选择性,分子内 Friedel-Crafts 缩合时,容易产生 Hayashi 重排。

改用 3-溴邻苯二甲酸(**148**)用氯化锡催化进行烷基化反应,具有位置专一性(图 18－18)[25]。

二、应用 Michael 加成

3-氰基邻苯二甲酸酐(**155**)经叔丁醇钾作用生成阴离子,再与α,β-环己烯酮的衍生物(Michael 受体)反应生成蒽醌(图 18－19)。这里氰基既是活化基团又是离去基团。此反应与 Friedel-Crafts 酰化反应相比,其优点是产物的位置是确定的[26]。

Lewis酸

Hayashi重排

H^+

148　149　150　151

152　153　154 (islandicin)

图 18－18

a. $SnCl_2$, CH_2Cl_2; b. Et_3SiH, TFA; c. TFAA, TFA; d. CrO_3, HOAc; e. $AlCl_3$, $C_6H_5NO_2$

t-BuOK,DMSO

155　156

图 18－19

三、应用 Diels–Alder 反应

用经典的 Diels–Alder 反应所得产物，与 Friedel–Crafts 反应一样，位置选择性差。Cano 用 3–羟基 2–吡喃酮(**157**)与氯代萘醌(**158**)在氧化铅存在下在乙腈中回流 8 天，一步反应得到 20%产率的化合物 **159**(图 18－20)[27]。供电子的 3–位羟基控制着 Diels–Alder 反应的方向。

157 + 158 —PbO_2, CH_3CN→ 159

图 18－20

四、*N*,*N*–二乙基苯甲酰胺的邻位金属化[28]

N,*N*–二乙基–3,5–二甲氧基苯甲酰胺 **160** 在仲丁基锂作用下在酰胺的邻位形成碳负离子，此碳负离子和醛 **161** 作用得一醇中间体，在对甲苯磺酸作用下，该醇中间体形成内酯 **162**，**162** 经还原得到酸 **163**，在氟乙酸催化下 **163** 环合成 **164**，**164** 由三氧化铬氧化成蒽醌 **165**。**165** 在吡啶烟酸盐作用下得 catenarin **166**，而在三溴化硼作用下得另一产物毛罂红(erythroglaucin)**167**，如图 18－21 所示。

160 + 161 —a→ —b→ 162 —c→ 163 —d→ 164

e → 165 f → 166 (catenerin)

g → 167 (erythroglaucin)

图 18－21

a. BuLi, TMEDA-Et_2O; b. TsOH, PhMe; c. Pd/C, H_2, HAc; d. TFAA, $CHCl_3$; e. CrO_3, HOAc; f. Py-HCl; g. BBr_3, CH_2Cl_2

第五节 木 脂 体

木脂体是由 C_6C_3 单元[丙烯基酚及其衍生物和(或)烯丙基酚及其衍生物]氧化聚合而成的一类天然产物。通常是指其二聚体,其中鬼臼毒素和五味子素类化合物较有代表性,其合成研究也比较活跃。

一、鬼臼毒素

鬼臼毒素(podophyllotoxin)的衍生物 VP-16-213 和 VM-26 早已成为抗癌药物,所以其合成比较受重视,下面介绍两种方法。

(1) 串联 1, 4-1, 2-加成[29]

168 169 170 → 171 $\xrightarrow[NIS]{SnCl_4}$ 172

硫缩酮负离子(**168**)与α,β-不饱和酮(**169**)进行 Micheal 加成,以芳香醛(**170**)俘获阴离子中间体,则生成化合物 **171**,再经四氯化锡环化,NIS 水解,得到(±)-异

鬼臼脂酮(**172**)。产率高达 60%以上。若将化合物 **171** 以 Raney Ni 还原,再用四氯化锡环化,则在 1–位生成亚甲基,得到(±)–去氧异鬼臼脂素,产率在 70%左右。

(2) 用 Diels–Alder 反应

在有关鬼臼毒素和其类似物的报道中,关于它们的不对称合成的报道却很少。1996 年,Bush 和 Jones[30] 报道了一条不对称合成(–)–鬼臼毒素的路线,总共八步,总产率 15%。其中的关键一步是使用 Feringå s 亲二烯体(**174**)和邻醌型吡喃酮(**173**)立体选择性的 Diels–Alder 反应,其定位选择性和立体选择性都很高,合成路线如图 18–22 所示。

图 18–22

a. 50℃, MeCN, 碱洗反应瓶; b. AcOH, 49℃; c. H_2, 10% Pd/C, EtAc; d. $Pd(OAc)_4$, AcOH/THF (1∶5); e. HCl, 二氧六环; f. CH_2N_2, $Et_2O/MeOH$; g. $LiEt_3BH$, THF, –78℃; h. HCl, THF; i. $ZnCl_2$, THF, 分子筛

所有取代基的正确立体化学是在氢解不饱和内酯这一步中建立起来的,但是在用四乙酸铅氧化时,在 1–位形成了一对异构体。这对异构体可以分离出来以用于下一步合成,最后得到的鬼臼毒素的对映纯度为 98%。

二、五味子素

五味子素类化合物具有重要的生理活性和复杂的立体化学,引起了许多有机化学家的合成研究的兴趣。至今,已有多种合成路线发表,这里介绍几条有代表性

的路线。

Takeya 等[31] 利用酮缩合法进行五味子素类化合物的合成,其方法较简便,所用的试剂较廉价易得,但该方法只适用于芳核上取代基对称的化合物,如五味子丙素(Wuweizisu C)。

180　181　182　183　184　185　186　187　188

图 18 - 23

a. $EtNO_2$, 苯, 哌啶; b. Fe-$FeCl_3$, HCl; c. $TiCl_4$-Zn, THF; d. 原甲酸三乙酯, 苯甲酸; e. PtO_2, AcOH, H_2; f. $Fe(ClO_4)_3$, MeCN

醛 **180** 与硝基乙烷(在六氢吡啶存在下)于苯中回流,生成硝基中间体 **181**,后者以铁粉、三氯化铁和浓盐酸还原水解,得β–酮基化合物 **183**,继而在苯甲酸存在下以原甲酸三乙酯脱羟基生成烯的(*Z*)–**185**、(*E*)–**186** 异构体混合物,其中 *E*–异构体在环己烷中(碘催化下)用紫外光照射可以转化成(*Z*)–异构体,它们分别在乙酸中用氧化铂催化氢化得顺式二甲基和反式二甲基中间体。最后顺式二甲基中间体用高氯酸铁在无水乙腈中氧化偶合,得(±)–五味子丙素 **187**。反式二甲基中间体氧化偶合得到五味子丙素的差向异构体 **188**(图 18–23)。

Mervic 等[32] 发展了一种由菲衍生物合成该类化合物的方法,该方法的收率较高,并可合成八元环氧取代和芳基取代不同的化合物。以(±)–kadsurin (**198**)的合成为例。

溴代芳香醛(**189**)在甲基锂存在下进行 Wittig 反应,生成烯的(*E*)–和(*Z*)–异构体。该混合物在四氢呋喃和环己烷溶液中,在碘存在下,用中压汞灯照射,生成菲衍生物(**191**)。随后以四氧化锇、三氧化硫吡啶络合物氧化得酮(**192**)。氧化产物与格氏试剂反应延伸两个碳并同时脱溴得 **193**,然后用四乙基铅氧化得产物 **194**,**194** 再经溴化,Zn–Ag 或 Zn–Cu 环合,生成(±)–联苯环辛二烯酮(**195**)。将化合物 **195** 在乙酸中以 Pd/C 催化氢化,由于与芳环共平面的酮容易氢化还原,仅使一个酮基还原成羟基,而且氢从立体位阻小的方向进攻,生成了羟基与两个甲基同处于α–位的顺式产物(**196**)。在甲磺酰氯与吡啶作用下将 **196** 的羟基甲磺酰化得 **197**, **197** 以锂铝氢还原,再乙酰化得(±)–kadsurin (**198**)(图 18–24)。

图 18－24

a. LiMe; b. UV, I_2, THF, C_6H_{12}; c. OsO_4, Py; d. SO_3/Py; e. EtMgBr, PhH; f. $(PbOAc)_4$, PhH, Py; g. Br_2, 醚; h. DMSO/DMF, Zn/Ag; i. Pd/C, AcOH, H_2; j. MsCl, Py; k. LAH; l. Ac_2O

Tanaka 等[33] 使用对映选择性的方法建立环辛二烯环,合成了一系列的化合物,其中包括五味子丙素、gomisin J、gomisin N 和 γ-schizandrin。下面以五味子丙素为例。以对映选择性地催化氢化不饱和酯(**197**),引入第一个手性中心,以这个手性中心控制其他手性中心的产生。另一个芳香基团以醇醛缩合,消除的策略引入到内酯(**200**)上。用高氯酸铁氧化偶合,接着经过加氢,还原,生成五味子丙素 **203**(图 18－25)。

图 18－25

a. (S, S)-MOD-DIOP, H_2, $Rh(COD)_2BF_4$; b. $Ca(BH_4)_2$, KOH; c. HCl; d. $LiN(i\text{-}Pr)_2$; 3-甲氧基-4, 5-亚甲二氧基苯甲醛; e. Ac_2O, Net_3, DMAP; f. DBU; g. $Fe(ClO_4)_3$, CF_3COOH, CH_2Cl_2; h. H_2, Pd/C; i. i-BuAlH; j. $MeSO_2Cl$, Net_3; k. $LiBHEt_3$

第六节　大环内酯类抗生素的合成

大环内酯类抗生素的结构和立体化学复杂性引起了有机化学家的极大兴趣,对它们进行合成研究大大地促进了合成方法学的创新。其结果是在立体选择性合成此类化合物中的惊人进展使得构建此类化合物的效率大大提高。在此领域内的进展使我们不可能在这里做一个全景式的描述,我们只选择介绍其中 3 个有代表性的化合物:夹竹桃内酯(oleandomycin)、fluvirucin B_1 和 macrolactin A。虽然这 3 个化合物都属于大环内酯抗生素,但是其用于构建大环的方法都很精巧且各不相同,很是引人注目。

oleandomycin　　fluvirucin B_1　　macrolactin A

一、夹竹桃内酯

夹竹桃内酯(oleandomydin)的结构和药理作用和红霉素很接近。分于内有多个手性中心,自1990年以来有3个合成的报道,分别是Tatsuda[34]、Paterson[35]和Evans[36]。它们的合成为不对称构建此类化合物提供了很好的范例。其中Evans利用夹竹桃内酯上手性基团互相接近的特点,利用底物控制的策略,非常简洁地实现了合成。Evans第一个将酰亚胺辅剂(Evans试剂)用于不对称合成具有多个丙酸结构的化合物。一个非常高效和优美的例子是利用β-酮酸亚胺**204**和醛**205**之间的醇醛缩合反应构建二丙酸片段。在这里也就是C(1)-C(8)片断的合成。利用Ti(*i*-OPr)Cl_3和三乙胺处理**204**,导致了C(4)上的酮化学选择性地烯醇化,此顺式烯醇选择性地和**205**反应生成**206**(图18-26)。

Ti(*i*-OPr)Cl_3

204 **205** **206**

图 18-26

为制备C(9)-(10)部分,相应的立体化学用三氟乙酸锡催化的醇醛缩合而得,所得的**207**是异构体比例为83∶17的混合物。和用Ti催化的反应相反,这次得到的产物的立体化学是反式的,对此Evans在他的很多文章中都做了探讨。将**207**直接$Me_4NBH(Oac)_3$还原成1,3-*anti*-醇**208**(图18-27)。此试剂是由Evans发展,用于非对映选择性还原β-羟基酮生成1,3-*anti*-二醇。

$Sn(OTf)_2$,MeCHO　　$Me_4NBH(OAc)_3$

204 **207** **208**

图 18-27

将**206**经过必要的转化生成**209**。在Evans的合成中,有战略性意义的一步是汇聚两个高度官能化的片段(**209**和**210**)。这一步创新性地以钯催化进行将烯基锡**209**用酰氯**210**、$Pd_2(dba)_3$、*i*-PrNEt在苯中处理,得到不饱和酮**211**,产率85%。在合成了C(1)-C(14)片段后,他们选择了用9-(*S*)羟基控制下的Sharpless环氧化反应,立体选择性地形成C(8)的环氧。至此,所得的开链化合物**212**具有大环上所有需要的手性中心,而合成这一片段,Evans从**204**开始只用了11步(图18-28)。

209　+　210

$\xrightarrow{Pd(dba)_3, i\text{-}Pr_2NEt}$ 211

$\xrightarrow{HF, Py, Zn(BH_4)_2, VO(acac)_2, t\text{-}BuOOH}$ 212

图 18－28

最后，Evans利用 Yamagushi 的方法[33]，将含环氧基的开链酸 **213** 关环成大环内酯化合物 **214**（图 18－29）。将 **214** 脱保护，氧化，可得到合成的夹竹桃内酯。

213 $\xrightarrow{2,4,6\text{-}Cl_3C_6H_2COCl,\ DMAP,\ i\text{-}Pr_2NEt,\ CH_2Cl_2}$ 214

图 18－29

二、Fluvirucin B_1

和夹竹桃内酯不同的是，Fluvirucin B_1 只有少数几个相距很远的手性中心，这就难以采用底物控制的方法进行构建，而且具有迷惑性的简单使大环的构建非常困难，

因为这个环具有高度的柔性,从而使成环非常困难。两个研究小组"发表了他们的合成,其中相距遥远的手性中心和十四元环都是依靠过渡金属催化构建的[38]。

Hoveyda 以 **215** 为原料,该化合物可以用 Ti(Ⅳ)催化的 Sharpless 动力学拆分外消旋体得到。非对映选择性地将 **209** 用 Cp_2ZrCl_2 催化下乙基镁化(该方法由 Hoveyda 发展而来),得到 **216**(图 18－30)。再将其原位与过量 *N*–甲苯磺酰环乙亚胺反应,生成 C(6)–C(13)片段,具有所有需要的官能团,对映选择性高达 97∶3。

EtMgBr, Cp_2ZrCl_2

OH　OMgX　MgX　Et　NTs　OH　NHTs　Et

215　216　217

图 18－30

合成另一个片段同样使用了 Haveyda 催化定位选择性地乙基镁化。这次使用的底物为 3,5–二氢呋喃,乙基溴化镁在 **219** 的催化下用过量二氢呋喃处理,以 99%的 ee 值得到 **220**。将此烯醇用 *n*–PrMgBr 和 3%(摩尔分数)Cp_2TiCl_2 处理氢镁化成 **221**。**221** 原位与溴乙烯在 3%(摩尔分数)$(Ph_3P)_2NiCl_2$ 偶合生成 **222**,总产率 72%(图 18－31)。

219　a　b　c　O　OH　BrMg　OMgBr　OH

218　220　221　222

图 18－31

219 = (*R*, *R*)–thylene–1,2–bis(η^5–4,5,6,7–tetra–hydro–1–indenyl)titanium(–1,1′–binaphth–2,2′–diolete

a. EtMgBr; b. *n*–PrMgBr, 3%(摩尔分数)Cp_2TiCl_2; c. 溴乙烯, 3%(摩尔分数)$(Ph_3P)_2NiCl_2$

将 **222** 氧化成酸,将其与片段 **217** 偶联后可得化合物 **223**,接上糖原,再在 20%的 Schrock 催化剂 **224** 的催化下以 92%的产率得到 **225**。如果在关环后接糖原,得不到所需要的化合物。将 **225** 催化氢化以 84%的产率和 98%的 de 值得到所需的产物,而后脱保护可得 fluvirucin B_1(图 18－32)。

图 18－32

224 = Mo(CHCMe$_2$Ph)[N(2,6-(*i*-Pr)$_2$C$_6$H$_3$)][OCMe(CF$_3$)$_2$]$_2$

三、Macrolactin A

Macrolactin A 是一个具有多个二烯结构的大环内酯,初步的研究表明它能致使 T-淋巴细胞抑制 HIV 病毒的复制。但是这种新型的大环内酯在自然界中非常难以获得,因而其生物活性的研究只能依赖于实验室的合成。由此而引起的合成挑战吸引了不少小组去寻求有效的合成方法。3 个不同的小组[39]独立报道了合成 macrolactin A 的核心部分,其中两个小组得到了目标分子。

第一个全合成 macrolactin A 由 Smith 所报道,研究人员通过钯催化的偶联反应,变换所用的烯基锡和碘化物的反应部分,对 C(9)-C(10)的成键进行了精确的研究。合成含有 C(7)、C(13)和 C(1)手性中心片段时,采用了以手性烯丙基硼烷[(*R*)-、(*S*)-diisopinycampheyl allylboranes]立体选择性地将丙炔醛烯丙基化得到 **226**、**232**,其 ee 值高达 90%。通过保护二级醇和臭氧化断裂 **226** 的端位烯键生成

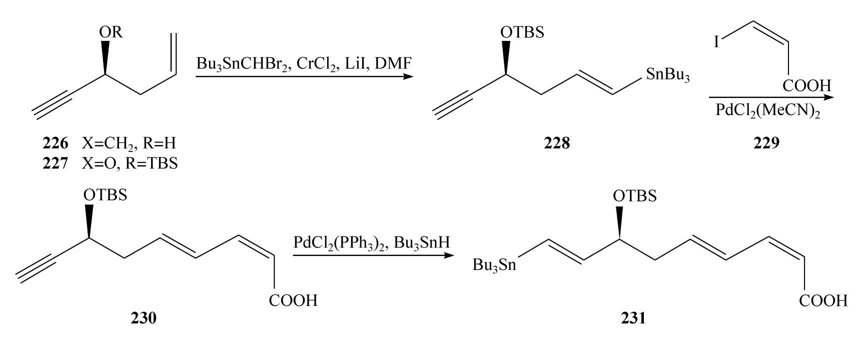


图 18－33

醛 **227**，将其和 $CrCl_2$、LiI、$Bu_3SnCHBr_2$ 作用得到了 **229**。这个烯基锡用作一系列化学选择性把催化转化的起始原料，直至得到 **231**，在这中间，用顺式 3-碘丙烯酸 **229** 和 **228** 偶联，以及炔基氢锡化时，羧基并没有保护(图 18－33)。

226 的对映异构体 **232** 用作另一个片段的起始原料。经转化成炔 **233** 后，化学选择性地氢锡化给出烯基锡 **234**，它在锡卤交换后得 **235**。将此烯基碘与烯基锡 **236** 偶联后生成含有 C(9)–C(24)的片段 **237**，将 **237** 氧化所得醛用 Stork 试剂转化成烯基碘 **238**(图 18－34)。此片段含有 macrolactin A C(9)–C(24)所要求的手性中心和反式双键。

图 18－34

a. $PdCl_2(PPh_3)_2$，n-Bu_3SnH；b. $PdCl_2(MeCN)$；c. Dess–Martin；d. $(Ph_3PCH_2I)I$，NaHMDS

在 Smith 的合成中，以 C(9)–C(10)之间成键实现了最后的环合，他们使用了两组不同的前体：C(9)锡化物/C(10)碘化物和 C(9)碘化物/C(10)锡化物。在优化关环条件时对保护基做了必要的更换(R = Et)，以 56%的产率得到了保护的 macrolactin A 经脱保护即可得到合成的 macrolactin A。

参 考 书 目

[1] 徐任生.天然产物化学.北京:科学出版社,1993
[2] 吴毓林,姚祝军.现代有机合成化学.北京:科学出版社,2001
[3] Nicolaou K C E J.Classics in Total Synthesis.New York,Cambridge,Tokyo:VCH,Sorensen, Sorensen–Weinheim,1996
[4] Hale K J.The Chemical Synthesis of Natural Products.Sheffield:Sheffield Academic Press Ltd,2000

参 考 文 献

[1] (a) Corey E J, Su W G. Tetrahedron Lett, 1985, 26:281
(b) Adams J, Fitzsimmons B J, Girand Y et al.J Am Chem Soc, 1985, 107:464
[2] (a) Nagaoda H, Miyaoka H, Miyaoshi T et al. J Am Chem Soc, 1986, 108:5019
(b) Suzuki M, Morida Y, Yanagisawa A et al. J Am Chem Soc, 1986, 108:5021
(c) Suzaki M, Morida Y, Yanagisawa A et al. J Org Chem, 1988, 53:286
[3] (a) Kagan H B. Bull Soc Chim Fr, 1988, 846
(b) Scott J W. Top Streerochem, 1989, 19:209
(c) Crosby J. Tetrahedron, 1991, 47:4789
(d) Akutagawa S. Organic Synthesis in Japan. Past, Present,and Future. Tokyo:Tokyo Kagaku Dozin, 1992, 75
[4] (a) Toth J E, Hamann P R, Fuchs P L. J Org Chem, 1988, 53:4694
(b) Parker K A,Fokas D. J Am Chem Soc, 1992, 114:9688
(c) Hong C Y, Kado N,Oveman L E. J Am Chem Soc, 1993, 115:11 028
(d) Trauner D, Bats J W, WenerY A et al. J Org Chem, 1998, 62:5250
[5] Woodward R B, Cava M P, Ollis W D. J Am Chem Soc, 1954, 76:4749
[6] (a) Magnus P, Giles M, Bonnert R et al.J Am Chem Soc, 1992, 114:4403
(b) Magnus P, Giles M, Bonnert R et al. J Am Chem Soc, 1993, 115:8116
(c) Kuehne M E,Xu F. J Org Chem, 1993, 58:7490
(d) knight S D, Overman L E,Ariaudeau G. J Am Chem Soc, 1993, 115:9293
(e) Rawal V H,Iwasa S. J Org Chem, 1994, 59:2685
(f) Martin S F, Clark C W,Ito M et al. J Am Chem Soc, 1996, 118:9804
[7] Shanghai No. 5 Phannacelltical Plant et al. Scinitia Sinaca, 1978, 21:87
[8] (a) Comins D I, Hong H, Jianhua G. Tetrahedron Lett, 1994, 35:5331
(b) Comins D L, Baevsky M F,Hong H. J Am Chem Soc, 1992, 114: 10 971
[9] Ejima X et al. J Chem Soc Perkin I, 1990:27
[10] Woodward R B et al. Tetrahedron, 1958, 2:1
[11] Corey E J et al. J Am Chem Soc, 1980, 102:6603
[12] 徐任生. 天然产物化学. 北京:科学出版社, 1993,220

[13] Bald E et al. Chem Lett, 1975:1163
[14] Noyori R. Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis. New York:John Wily & Sons Inc, 1994,96
[15] Xu X X, Zhu J, Huang D Z et al. Tetrahedron, 1986, 42:819
[16] Lee J,Synder J K. J Am Chem Soc, 1989, 111:1522
[17] Sher F T, Berchtold G A. J Org Chem, 1977, 42:256
[18] Yang D, Ye X Y, Xu M. J Org Chem, 2000, 65:2208
[19] van Tamelen E E, Demers J P, Taylor E G et al. J Am Chem Soc, 1980, 101:5424
[20] Crisp G T, Meyer A G. J Org Chem, 1992, 57:6972
[21] 徐任生等. 化学学报, 1979, 37, 289
[22] (a) Baker W J. Chem Soc, 1933, 1381
(b) Mahal H S et al. J Chem Soc, 1934, 1767
[23] (a) Alger J et al. Proc R Irish Acad, 1934, 42B:1
(b) Oyamnada T. Bull Chem Soc Japan, 1935, 10:182
[24] Joshi P C et al. J Chem Soc, 1934:513
[25] Kim K S et al. Tetra Lett, 1979, 4:331
[26] Kraus G A et al. J Org. Chem, 1983, 48:3439
[27] Cano P et al. J Org Chem, 1983, 48:5373
[28] de Silva S O et al. J Org Chem, 1979, 44:4802
[29] Zieger F E et al. J Org Chem, 1978, 43:985
[30] Bush E J, Jones D W. J Chem Soc, Perkin Trans Ⅰ, 1996, 1:51
[31] Takeya T et al. Chem Pharm Bull, 1985, 33:3599
[32] (a) Marvic M et al. J Am Chem Soc, 1977, 99:7673
(b) Ghera E et al. J Chem Soc Commun, 1978:480
[33] (a) Tanaka M, Mitsubashi H, Maruno M et al. Tehahedron Lett, 1994, 35:3733
(b) Tanaka M, Ohshima T, Mitsuhashi H et al. Tetrahedron, 1995, 51:11 693
[34] Tatsuda K, Ishiyama T, Takima S et al. Tetrahedron Lett, 1990, 31:709
[35] Paterson I, Norcross R D, War R A et al. J Am Chem Soc , 1994, 116:11 287
[36] Evans D A, Kim A S, Metternich R et al. J Am Chem Soc, 1998, 120:5921
[37] Inanaga J, Hirata K, Saeki H et al. Bull Chem Soc Janpan, 1979, 52: 1989
[38] (a) Houri A F, Xu Z, Cogan D A et al. J Am Chem Soc, 1995, 117:2943
(b) Xu Z, Johannes C W , Salman S S et al. J Am Chem Soc, 1996, 118:10 926
(c) Xu Z, Johannes Z W, Houri A F et al. J Am Chem Soc, 1997, 119:1032
(d) Trost B M, Ceschi M A, Konig B. Angew Chem, Int Ed Engl, 1997, 36:1486
[39] (a) Pattenden G,Boyce R J. Tetrahedron Lett, 1996, 37:3501
(b) Kim Y, Singer R A, Carreira E M. Angew Chem, Int Ed Engl, 1998, 37: 1261
(c) Smith A B,Ott G R. J Am Chem Soc, 1998, 120:3935

附　录

附录一　西文主题索引

A

B

C

D

E

F

G

H

I

J

K

L

M

N

O

P

Q

R

S

T

U~X

附录二 中文主题索引(以汉语拼音为序)

A

B

C

D

E

F

G

H

J

K

L

M

N

O~ P

Q

R

S

Z